



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τελευταίες εξελίξεις στον προγεννητικό έλεγχο με single cell PCR
και Quantitative (QF – PCR).

**ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ – ANNA ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2016**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων : Δαπόντε Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Σύμβουλος : Γεροβασίλη Αγγελική, Διδάκτωρ Γενετικής
Μέλος : Γκαράς Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	σελ 4
2. Προγεννητικός έλεγχος.....	σελ 5
2.1.1 Προγεννητικός έλεγχος – 1ο τρίμηνο	σελ 6
2.1.2 Προγεννητικός έλεγχος –2ο τρίμηνο	σελ 6
2.1.3 Ηλικία της μητέρας και ηλικία κύησης	σελ 7
2.1.4 Προγεννητικός έλεγχος- είδη	σελ 8
3. Καρυότυπος	σελ 10
4.Quantitative Fluorescent PCR	σελ 11
4.1 STRs δείκτες	σελ 13
4.1.1 STRs δείκτες για τα χρωμοσώματα 21, 13, 18, X και Y	σελ 14
4.1.2 Χρήση των STRs στην Quantitative Fluoresence PCR	σελ 17
4.1.3 Χρήση των STRs στην QF-PCR για ανίχνευση φυλετικών ανωμαλιών	σελ 20
4.2 Προγεννητικός έλεγχος με Quantitative Fluoresence PCR	σελ 23
4.2.1 Ευαισθησία της Quantitative Fluoresence PCR	σελ 24
4.2.2 Πλεονεκτήματα της Quantitative Fluoresence PCR	σελ.26
4.2.3 Τεχνικοί περιορισμοί της μεθόδου – Μειονεκτήματα της QF- PCR	σελ 27
5. Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση –PGD	σελ 28
5.1 Single Cell PCR	σελ 29
5.1.1 Ειδική προετοιμασία για Single Cell PCR.....	σελ 30
5.1.2 Ειδικός εξοπλισμός για Single Cell PCR	σελ 30
5.1.3 Διαδικασία της Single Cell PCR	σελ 31
5.1.4 Πλεονεκτήματα της Single Cell PCR	σελ 32
5.1.5 Μειονεκτήματα της Single Cell PCR	σελ.33
5.1.6 Παράδειγμα εφαρμογής της Single Cell PCR	σελ 34
5.1.7 Συμπεράσματα – Συζήτηση	σελ 35
6. Βιβλιογραφία.....	σελ 36

1. Εισαγωγή

Ο προγεννητικός έλεγχος αναπτύχθηκε τα τελευταία 30 χρόνια και αποτελείται από μεθόδους screening με σκοπό να ανιχνεύσει εμβρυικές ανωμαλίες και συνεπώς να προσφέρει καλύτερη διαχείριση αυτών των εμβρύων ή επιλεκτική άμβλωση .

Έγκυες γυναίκες με αυξημένο ρίσκο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως γυναίκες με αυξημένη μητρική ηλικία , παθολογικούς βιοχημικούς δείκτες όπως β-HCG , PAPP-A , ή παρουσία υπερηχογραφικών ανωμαλιών στο έμβρυο πρέπει να υποβάλλονται σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο για ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή συγκεκριμένων γονιδιακών μεταλλάξεων .

Το gold standard για την προγεννητική διάγνωση αυτών των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι ο καρυοτυπική ανάλυση εμβρυικών κυττάρων που λαμβάνονται ύστερα από αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακής λάχνης . Δεδομένου όμως την ανάγκη για καλλιέργεια των κυττάρων αυτών κάτι τέτοιο συνεπάγεται περίπου μέσο όρο 14 ημέρες από τη λήψη του δείγματος μέχρι την ανακοίνωση του αποτελέσματος . Πάνω σε αυτό το μειονέκτημα του καρυότυπου, η επιστήμη στράφηκε στην ανεύρεση κάποιας άλλης μεθόδου -τεχνικής που να μην προαπαιτεί την καλλιέργεια εμβρυικών κυττάρων , συνεπώς να είναι σε θέση να δώσει με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια αποτελέσματα σε μικρότερο χρονικό διάστημα .

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική FISH για την ταχεία ανίχνευση των πιο κοινών χρωμοσωμικών ανευλοειδιών. Ενώ αργότερα τη θέση της κατέλαβε στην ταχεία προγεννητική διάγνωση η QF-PCR δεδομένου των πλεονεκτημάτων της έναντι της FISH . Με τη χρήση της QF-PCR είμαστε σε θέση να ανιχνεύσουμε τις πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 21, 13, 18, X και Y μέσα σε χρονικό διάστημα ακόμα και 5 ωρών από τη λήψη του δείγματος . Συνήθως, η ανακοίνωση των αποτελεσμάτων γίνεται σε 1 με 2 εργάσιμες ημέρες προσφέροντας έτσι σημαντικό πλεονέκτημα στη διαχείριση της κύησης .

Επιπλέον, με την ευρεία χρήση της προεμφυτευτικής διάγνωσης τα τελευταία 20 χρόνια ζευγάρια που βρίσκονται σε κίνδυνο για γέννηση παιδιού με ασθένεια που οφείλεται σε μονογονιδιακή διαταραχή , X φυλοσύνδετο νόσημα ή γνωστή χρωμοσωμική ανωμαλία μπορούν να επωφεληθούν με σκοπό την αναγνώριση γενετικά φυσιολογικών παιδιών και να πετύχουν μια φυσιολογική γενετικά κύηση/ γέννηση . Κάτι τέτοιο , μπορεί να επιτευχθεί με βιοψία 1 ή 2 βλαστομεριδίων από το έμβρυο την ημέρα 3 μετά τη γονιμοποίηση και χρήση single cell PCR με σκοπό την αναγνώριση γενετικά φυσιολογικών εμβρύων για εμβρυομεταφορά και συνακόλουθη κύηση. Έμβρυα που φέρουν τη μονογονιδιακή διαταραχή , τη X φυλοσύνδετη ασθένεια ή κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία δε μεταφέρονται στη μήτρα .

2 . Προγεννητικός έλεγχος

Ο προγεννητικός έλεγχος είναι μια σειρά από εξετάσεις που πραγματοποιούνται **πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης**, προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία της μητέρας, του εμβρύου και η ασφαλής πορεία του φυσιολογικού τοκετού. Στόχος του προγεννητικού ελέγχου είναι να εντοπίσει τους παράγοντες εκείνους που δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν επιπλοκές στην κύηση και τον τοκετό. Πραγματοποιείται τόσο στους **μελλοντικούς γονείς όσο και στο έμβρυο** και περιλαμβάνει τις εξής γενικές εξετάσεις:

1. Αιματολογικές εξετάσεις

Γενική Αίματος

- Ομάδα Ρέζους
- Ηλεκτροφόρηση Αιμοσφαιρίνης
- Αυστραλιανό αντιγόνο
- Ερυθρά & CMV αντιγόνα (IgG & IgM)
- RPR(μόνο σε άτομα που μπορεί να έχουν έρθει σε επαφή με σύφιλη)
- Αντισώματα για Τοξόπλασμα
- Σάκχαρο αίματος
- Ουρία
- Κρεατίνη
- Τρανσαμινάσες
- HIV

2. Γενική εξέτασης ούρων

3. Γυναικολογικές εξετάσεις

- Τεστ Παπ
- Καλλιέργεια κολπικών υγρών για ουρεόπλασμα, μυκόπλασμα και χλαμύδια
- Διακολπική υπερηχογραφική μελέτη των γεννητικών οργάνων
- Υπέρηχος μαστών όπου η ψηλάφηση το υπαγορεύει

4. Υπερηχογραφήματα

- Α τριμήνου (αυχενική διαφάνεια και PAP A)
- Β τριμήνου
- Γ τριμήνου
- Καρδιοτοκογραφία στο τρίτο τρίμηνο

5. Διαγνωστικές μέθοδοι για χρωμοσωμικές ανωμαλίες

- Τροφοβλάστη
- Αμνιοπαρακέντηση

6. Καμπύλη σακχάρως

2.1.1 Προγεννητικός έλεγχος - 1ο τρίμηνο

Ο προγεννητικός έλεγχος κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης στοχεύει στον **εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών ανωμαλιών για το έμβρυο**, όπως είναι η τρισωμία (τύπου 13, 18 και 21) και το σύνδρομο Down. Το υπερηχογράφημα με επικέντρωση κυρίως στη μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, η ηλικία της γυναίκας και τα επίπεδα των δεικτών PAPP-A και hCG στο αίμα της υπονήφιας μητέρας είναι τα στοιχεία εκείνα που βοηθούν στην ανίχνευση πάνω από το 90% εμβρύων με τρισωμία.

2.1.2 Προγεννητικός έλεγχος - 2ο τρίμηνο

Ο προγεννητικός έλεγχος κατά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης περιλαμβάνει το triple test ή το quadruple test και υπερηχογραφικά ευρήματα από το έμβρυο. Το triple test περιλαμβάνει τους εξής βιοχημικούς δείκτες στον ορό της μητέρας: τη μέτρηση της ελεύθερης β- HCG, άλφα φετοπρωτεΐνης AFP και της μη συνδεδεμένης οιστραδιόλης. Το quadruple test περιλαμβάνει τη μέτρηση των προαναφερθέντων δεικτών στο αίμα της μητέρας μαζί με την προσθήκη της ινχμπίνης A.

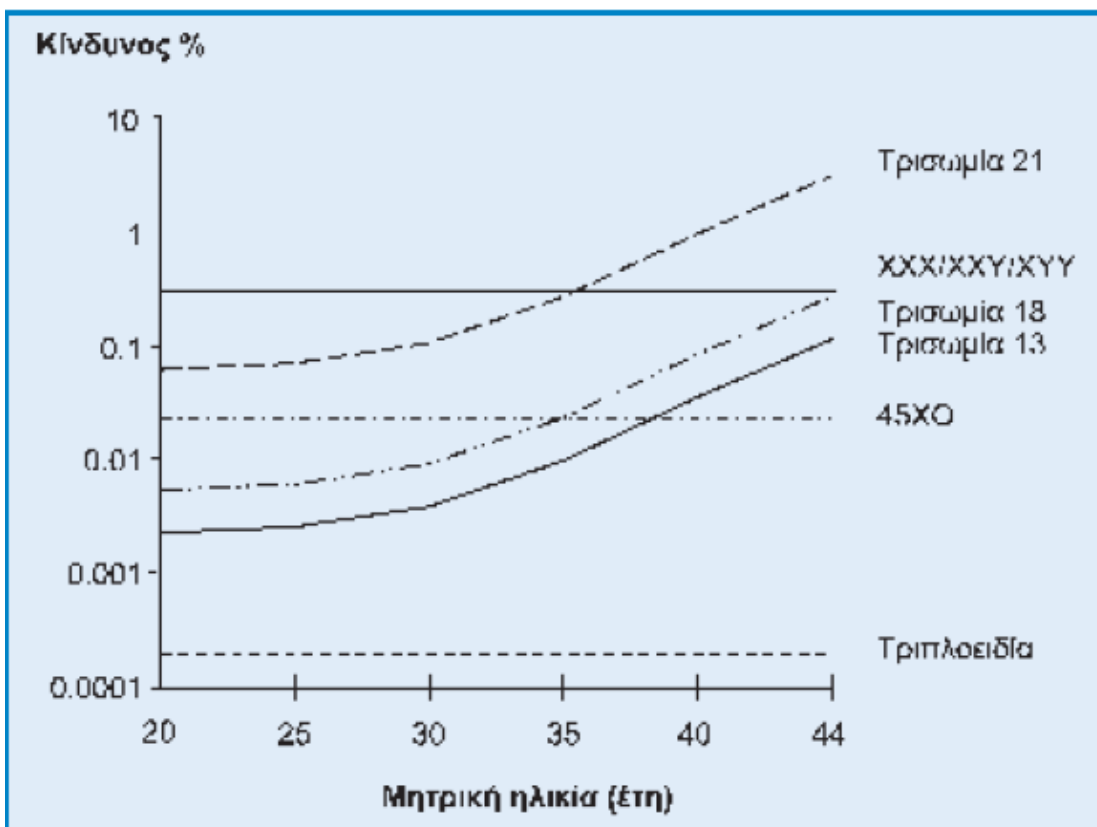
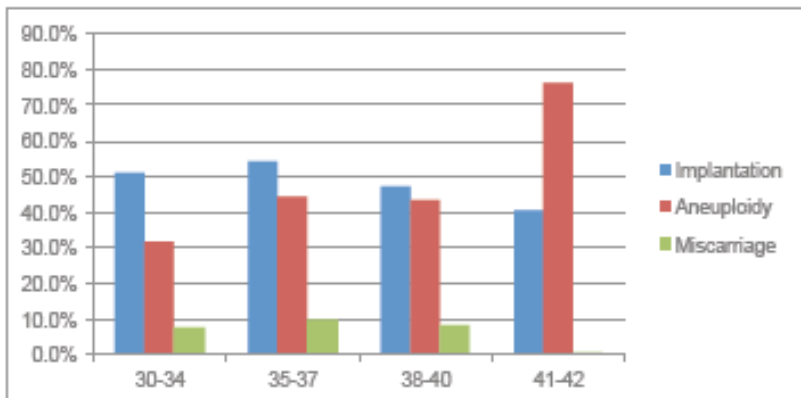
Στο διάστημα αυτό υπάρχουν οι **ιδανικές συνθήκες** για την πραγματοποίηση υπερηχογραφήματος β' επιπέδου, το οποίο παρέχει **σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη του εμβρύου**, τον πλακούντα, τον ομφάλιο λώρο και την αιμάτωση της μήτρας. Είναι, επίσης, δυνατό να ανιχνευθεί αξιόλογος αριθμός εμβρύων με σύνδρομο Down που δεν ανιχνεύθηκαν στον έλεγχο του 1ου τριμήνου.

Μέθοδοι διαλογής πληθυσμού	ΠΑ (%)
Μητρική ηλικία (ΜΗ)	30
ΜΗ και βιοχημικοί δείκτες στις 15–18 εβδομάδες	50–70
ΜΗ και εμβρυϊκή αυχενική διαφάνεια (ΑΔ) στις 11–13 ^{±6} εβδομάδες	70–80
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ, ελεύθερη β-hCG και PAPP-A στον ορό της μητέρας στις 11–13 ^{±6} εβδομάδες	85–90
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ και ρινικό οστό (ΡΟ) στις 11–13 ^{±6} εβδομάδες	90
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ, ΡΟ, ελεύθερη β-hCG και PAPP-A στον ορό της μητέρας στις 11–13 ^{±6} εβδομάδες	95

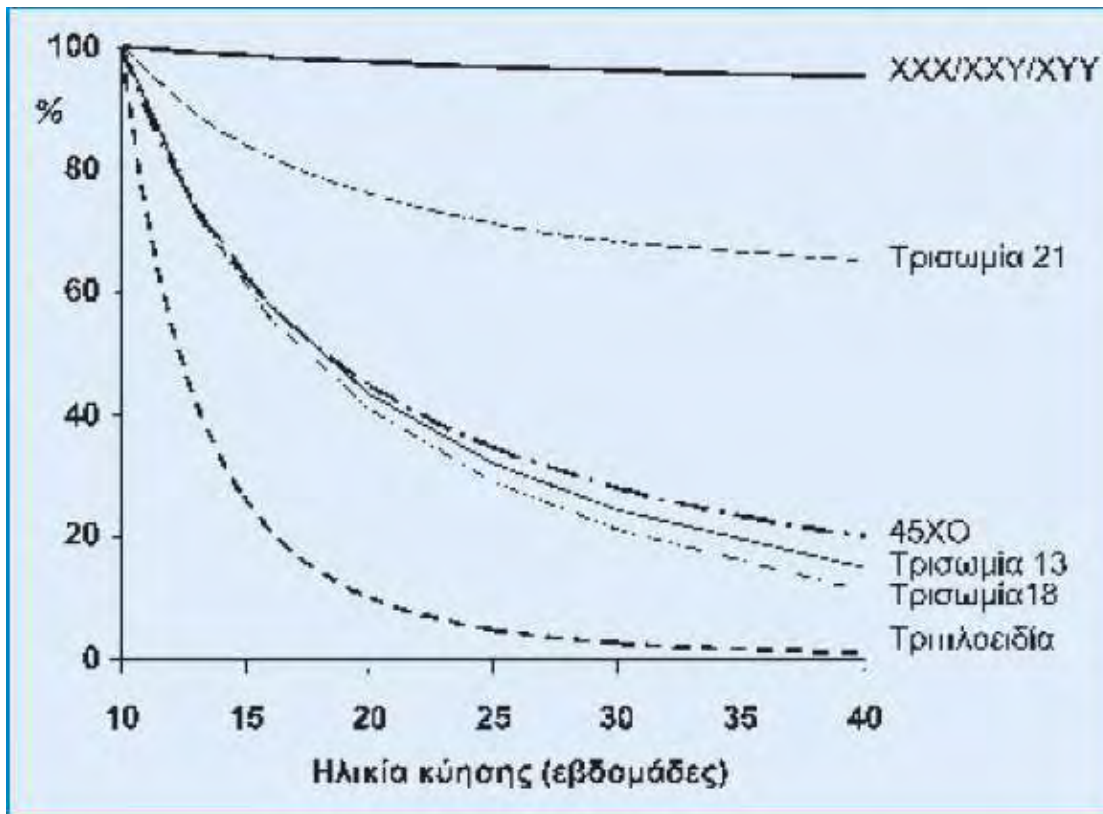
Πίνακας 1. Σύγκριση του ποσοστού ανίχνευσης (ΠΑ) διαφορετικών μεθόδων διαλογής πληθυσμού για τρισωμία 21, για ψευδώς θετικά αποτελέσματα της τάξεως του 5%.

2.1.3 Ηλικία της μητέρας και ηλικία κύησης

Όσο αυξάνει η μητρική ηλικία, αυξάνουν τα ποσοστά ανευπλοειδίας και μειώνονται τα ποσοστά εμφύτευσης (Εικόνα 1). Ο κίνδυνος για πολλές από τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες αυξάνει με την ηλικία της μητέρας (Εικόνα 2). Επιπλέον, επειδή τα έμβρυα με χρωμοσωμική ανωμαλία είναι πιο πιθανό να πεθάνουν ενδομητρίως, ο κίνδυνος ελαττώνεται με την ηλικία κύησης (Εικόνα 3).



Εικόνα 2. Σχετικός κίνδυνος για χρωμοσωμικές ανωμαλίες με βάση τη μητρική ηλικία.



Εικόνα 3. Σχετικός κίνδυνος για χρωμοσωμικές ανωμαλίες με βάση την ηλικία κύησης. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν το σχετικό κίνδυνο σε σχέση με αυτόν στις 10 εβδομάδες κύησης.

Συνεπώς, έγκυες γυναίκες με αυξημένο υπολογιζόμενο κίνδυνο από ειδικούς αλγορίθμους να αποκτήσουν παιδί με χρωμοσωμική ανωμαλία πρέπει να υποβάλλονται σε προγεννητικό έλεγχο με σκοπό την προγεννητική διάγνωση .

2.1.4 Προγεννητικός έλεγχος - είδη

Ο προγεννητικός έλεγχος διακρίνεται:

- ✓ στον επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο
 - Λήψη τροφοβλάστης- CVS (11-14w)
 - Αμνιοπαρακέντηση (16-20w)
 - Κορδοκέντηση
- ✓ Μη επεμβατική προγεννητικό έλεγχο
 - Εμβρυικά κύτταρα
 - Ελεύθερο εμβρυικό DNA (cffDNA) /RNA

Αναλυτικότερα , η λήψη χοριακών λαχνών γίνεται από την 11^η εβδομάδα της κύησης και αργότερα , γιατί όταν γινόταν σε μικρότερη εβδομάδα είχαν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά βλαβών στα μέλη (άκρα) των νεογνών . Το πλεονέκτημα αυτής της επέμβασης είναι πως η διάγνωση γίνεται 4 περίπου βδομάδες νωρίτερα σε σχέση με την αμνιοπαρακέντηση οπότε και η διακοπή της κύησης είναι ασφαλέστερη , σε περίπτωση παθολογικών αποτελεσμάτων .

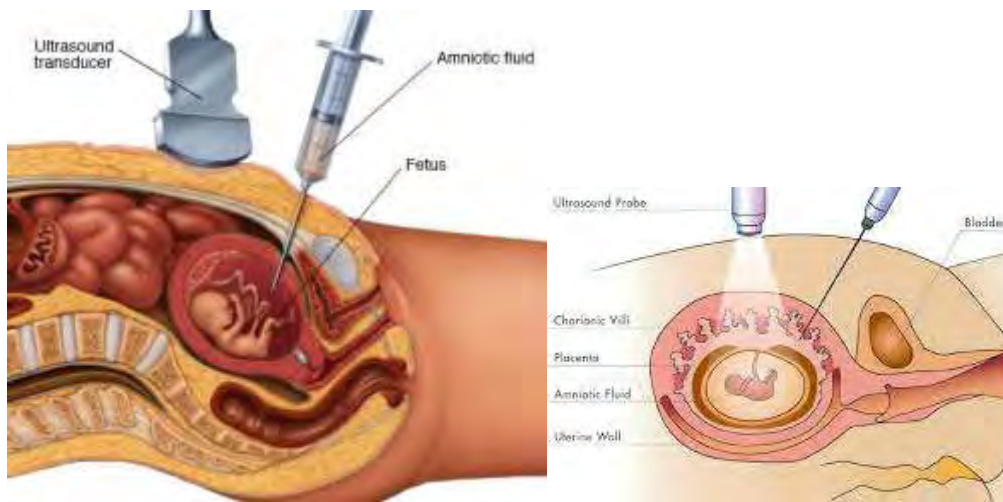
Η αμνιοπαρακέντηση θα πρέπει να γίνεται μετά την 16^η εβδομάδα της κύησης . Μετά από την εβδομάδα αυτή υπάρχει αρκετή ποσότητα αμνιακού υγρού και επιπλέον , ο αμνιακός σάκος έχει κολλήσει στα τοιχώματα της μήτρας και κατά συνέπεια η πιθανότητα ρήξης του από την επέμβαση είναι μικρότερη .

Εννοείται πως αν κριθεί απαραίτητο η επέμβαση μπορεί να γίνει σε οποιαδήποτε εβδομάδα της κύησης, μετά την 16^η , αν και μετά την 24^η εβδομάδα οι επιλογές μας είναι περιορισμένες μιας και στη χώρα μας απαγορεύεται μετά από την εβδομάδα αυτή η διακοπή της κύησης για οποιοδήποτε λόγο .

Η πιθανότητα αποβολής που υπάρχει τόσο με τη λήψη χοριακών λαχνών όσο και μετά την αμνιοπαρακέντηση είναι 1 % παραπάνω από την πιθανότητα αποβολής που υπάρχει σε άτομα που δεν υποβάλλονται στις επεμβατικές αυτές τεχνικές .Για το λόγο αυτό , ο κίνδυνος αυτός θα πρέπει να συνεκτιμάται και οι επεμβάσεις αυτές να γίνονται επί ενδείξεων και όχι ανεξέλεγκτα .

Σε ό,τι αφορά τα αποτελέσματα υπάρχει και για τις δύο επεμβατικές τεχνικές πιθανότητα 1/10000 ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων .

Η ποσότητα μωσαϊκισμού είναι για μεν τη λήψη λάχνης 1/100 και για την αμνιοπαρακέντηση 1/1000 .



3. Καρυότυπος

Ο καρυότυπος αποτελεί το Gold standard για την προγεννητική διάγνωση .

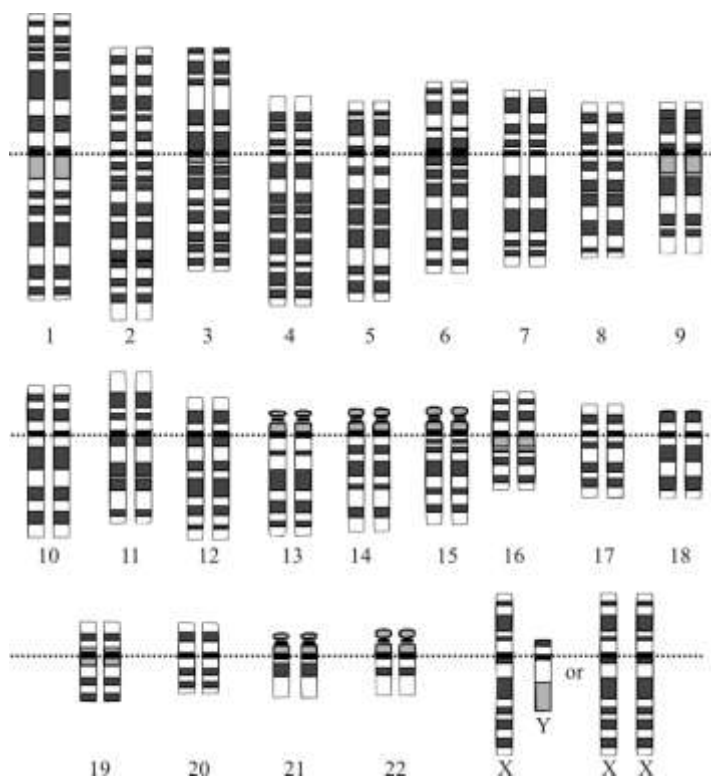
Η στάνταρ καρυοτυπική ανάλυση περιλαμβάνει τη μελέτη του αριθμού και της δομής και των 23 ζευγών των χρωμοσωμάτων .

Επομένως, είναι σε θέση να ανιχνεύσει αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες και πολυπλοειδίες καθώς και δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες όπως αναστροφές , μεταθέσεις, μικροδιπλασιασμοί, μικροελλείμματα, μικροενθέσεις στο έμβρυο με μεγάλη ακρίβεια. Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες , η εμφάνιση των οποίων αυξάνεται σε συχνότητα και σχετίζεται με τη μητρική ηλικία και λάθη στο μη – διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων , καταλήγουν είτε σε ένα επιπλέον αντίγραφο ή έλλειψη ενός χρωμοσώματος είτε σε όλα τα κύτταρα είτε σε ένα ποσοστό αυτών (μωσαϊκισμός) μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν με καρυότυπο .

Η ανάλυση του καρυότυπου πραγματοποιείται μετά από χρώση Giemsa των μεταφασικών χρωμοσωμάτων των εμβρυικών κυττάρων . Στη φάση αυτή του κυτταρικού κύκλου τα χρωμοσώματα είναι στο βέλτιστο βαθμό συμπυκνωμένα και είναι ορατά ευκρινώς με τον οπτικό μικροσκόπιο .

Προαπαιτείται όμως η καλλιέργεια των κυττάρων του εμβρύου για 2 εβδομάδες (ή και περισσότερο) πριν την ανάλυση .

Επομένως, η διάρκεια αυτή της διαδικασίας είναι μεγάλο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής .



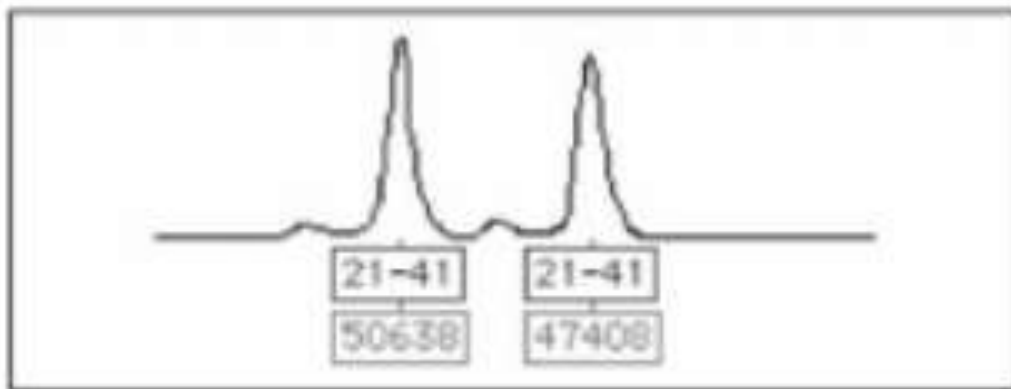
4. Quantitative Fluorescent PCR

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ,η FISH (fluorescence in situ hybridization) και αργότερα η QF-PCR , εισήχθηκαν στο πεδίο της προγεννητικής διάγνωσης για τις αυξημένου κινδύνου εγκυμοσύνες για να ξεπεράσουν το εμπόδιο που προέκυπτε από την ανάγκη για καλλιέργεια των κυττάρων .Τόσο η QF-PCR όσο και η FISH , δε χρειάζονται την καλλιέργεια κυττάρων για την πραγματοποίηση της διάγνωσης . Συνεπώς, ανήκουν στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για ταχεία προγεννητική διάγνωση των πιο κοινών ανευπλοειδιών

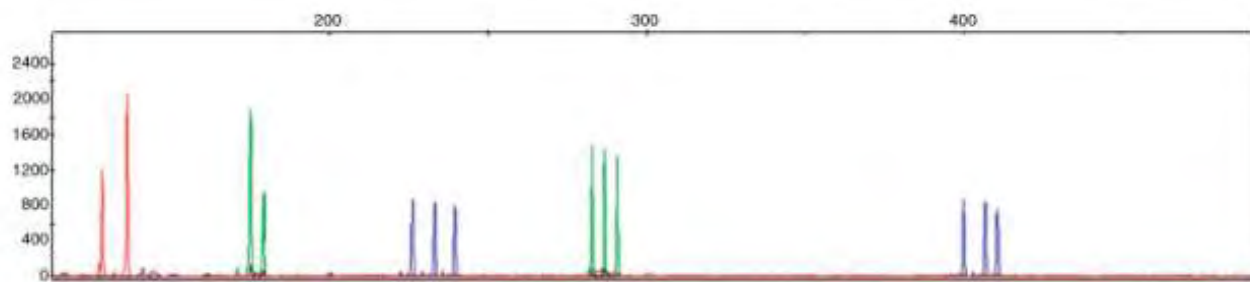
Συγκεκριμένα, η QF-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πιο κοινών ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 21, 18, 13, X και Y . Μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο για την ανίχνευση των παραπάνω ανευπλοειδιών όμως αποτελούν το 80% των κλινικά σημαντικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών που διαγιγνώσκονται στην προγεννητική περίοδο .

Βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών για κάθε χρωμόσωμα πολυμορφικών DNA αλληλουχιών –STRs δείκτες (short tandem repeats) και με τη χρήση φθορίζοντων εκκινητών, επιτυγχάνεται η ενίσχυση των τμημάτων αυτών .Τα διάφορα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να γίνουν ορατά και να ποσοτικοποιηθούν σαν κορυφή (peak areas) με τη χρήση αυτόματων DNA αναλυτών. Αμνιακό υγρό, τροφοβλαστικός ιστός , εμβρυικό αίμα , εμβρυικός ιστός από έμβρυα μετά από αποβολή ή επιλεκτική άμβλωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα για να εκτελέσουμε QF-PCR χρησιμοποιώντας παρόμοια πρωτόκολλα .

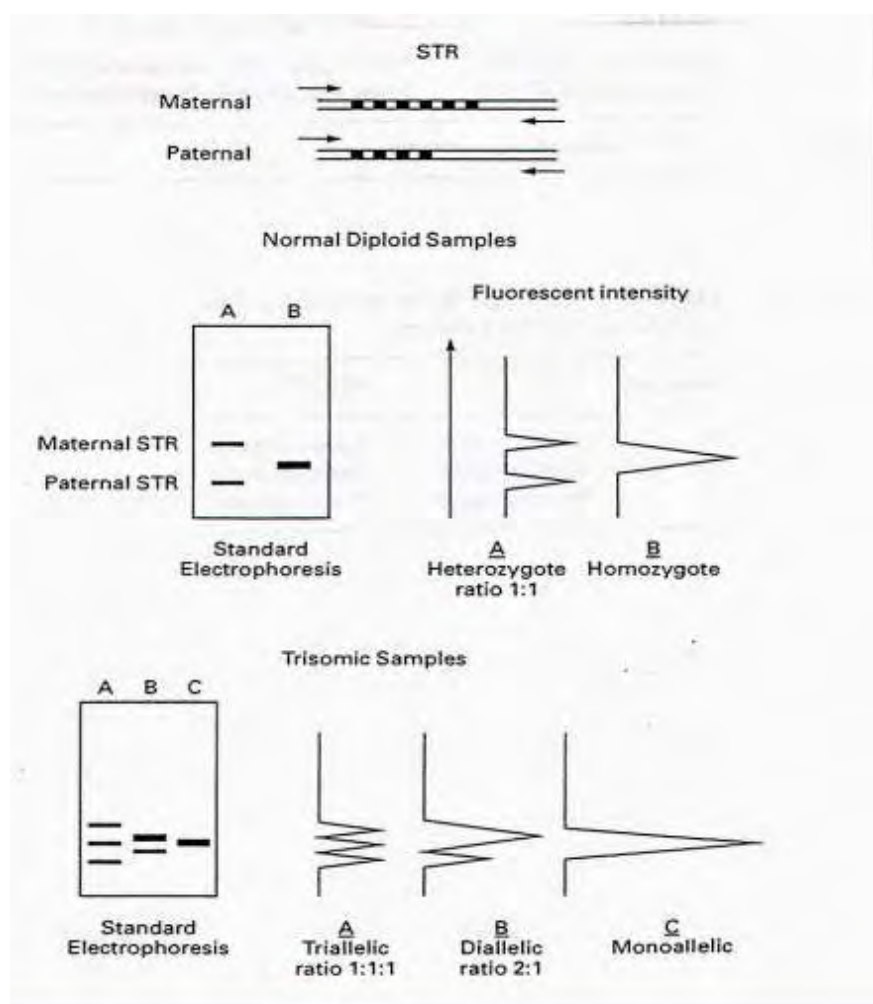
Για κάθε STR δείκτη, η αναλογία που προκύπτει από το ύψος των παραγόμενων κορυφών (peak height) αντιστοιχεί στην αναλογία των αλληλίων .



Τα φυσιολογικά αλληλόμορφα έχουν ποσοστό 0,8-1,4 το ένα σε σχέση με το άλλο (Pertl 2001)



Η τρισωμία χαρακτηρίζεται από ένα ποσοστό 1,8 και μεγαλύτερο της μιας κορυφής ως προς την άλλη ή 3 ισουψείς κορυφές .



Σχηματική αναπαράσταση QF-PCR με χρήση υψηλά πολυμορφικών STR περιοχών

4.1 STRs δείκτες

Τα STRs (short tandem repeats – σύντομες όμοιες επαναλήψεις) είναι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδίων που βρίσκονται η μία δίπλα στην άλλη (Sutherland and Richards, 1994) .Ένα STR μπορεί να κυμαίνεται σε μήκος από 2 έως 6 ζεύγη βάσεων (bp) με πιο συχνή την περίπτωση των τετρανουκλεοτιδίων (για παράδειγμα (GATA) σε μια γενετική περιοχή) και βρίσκεται συνήθως σε μη κωδική περιοχή δηλαδή εσώνιο .

Πολυμορφισμοί στα STR συμβαίνουν όταν ομόλογοι STR τόποι διαφέρουν ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων μεταξύ των ατόμων .

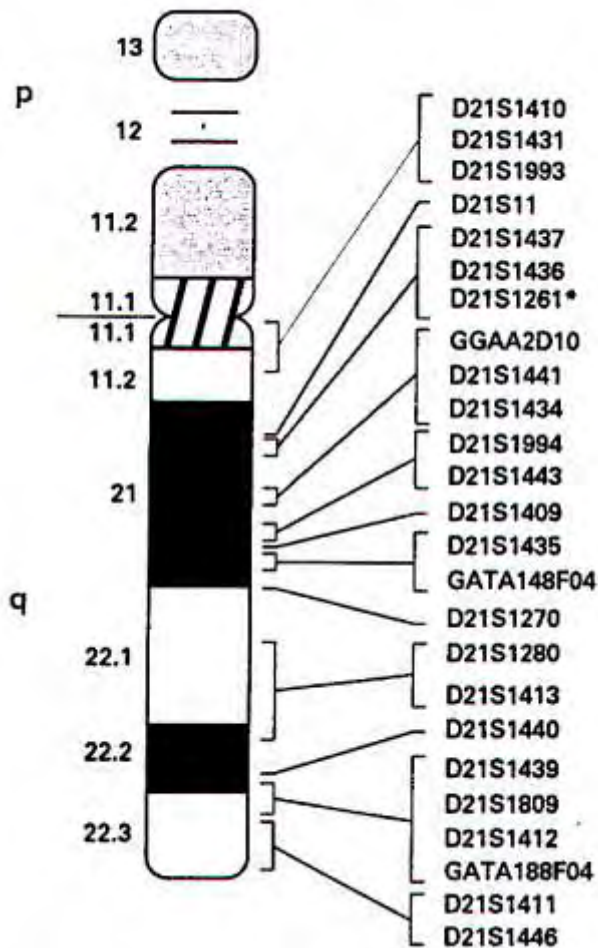
STRs δείκτες – Χαρακτηριστικά :

- Ποικίλλουν στο μήκος
- Ιδιαίτερα πολυμορφικά (διαφορετικά στους περισσότερους ανθρώπους)
- Ίδιος μήκος στον κάθε άνθρωπο κατά τη διάρκεια της ζωής του
- Το κάθε αλληλόμορφο κληρονομείται στον άνθρωπο με κλασσικό Μεντελικό τρόπο (ισοεπικρατή) κληρονόμησης
- Οι περισσότεροι από εμάς είμαστε ετεροζυγώτες
- Οι ομόζυγοι πιστεύεται ότι είναι το 5 % του πληθυσμού (Perl et al., 1994)
- Ιδανικά για να μελετάμε χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Mansfield et al.,1993, Adinolfi et al., 1995, Perl et al.,1996)



4.1.1 STRs για τα χρωμοσώματα 21,13,18 X και Y

Για κάθε χρωμόσωμα 21, 13, 18, X και Y υπάρχουν ειδικοί STR δείκτες .



Εντοπισμός υψηλά πολυμορφικών περιοχών STR που συστήνονται από την GDB για την ανάλυση του χρωμοσώματος 21 .



Εντοπισμός υψηλά πολυμορφικών περιοχών STR για την ανάλυση των χρωμοσωμάτων X και Y .

Marker name	Heterozygosity (%)	Size of PCR product (bp)	Primer sequence	Chromosome location	Source and reference
D21S11	90.0	225–280	TATGTGAGTCAATCCCCAAGTGA (F) GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG (R)	21q21	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1996
D21S1411	93.0	≥ 239	ATGATGAATGCATAGATGGATG (F) AATGTGTGTCCTTCCAGGC (R)	21q22.3	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1996
		256–340	GTAGATACATACATATGATGAATGC (F) TATTAATGTGTGTCCTTCCAGGC (R)		*Mann <i>et al.</i> , 2001
D21S1412	85.4	384–414	CGGAGGTTGCAGTGAGTTG (F) GGGAAGGCTATGGAGGAGA (R)	21q22.2	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1997
D21S1413	87.5	≥ 180	TTGCAGGGAAACCACAGTT (F) TCCTTGGAAATAATCCCCG (R)	21	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2001
D21S1414 (amplifies the same region as D21S11 but produces a 122bp larger amplicon)	88.0	≥ 291	GGCACCAGTAAAAAATTACT (F) CTGTCTGTCTGTCTATC (R)	21q21	GDB
		330–380	AAATTAGTGTCTGGCACCAGTA (F) CAATCCCCAAGTGAATGCCCTC (R)	21q21	*Pertl <i>et al.</i> , 1996
D21S1435	79.0	163–187	CCCTCTCAATTGTTGTCTACC (F) GCAAGAGATTCAGTGCCAT (R)	21q21	GDB, Cirigliano <i>et al.</i> , 2001
D21S1270	86.0	285–340	CTATCCCACTGTATTATTCAGGGC (F) TGAGTCTCCAGGTTGCAGGTGACA (R)	21q21–q22.1	Mann <i>et al.</i> , 2001
D21S226	59.0	440–470	GCAAATTTGTGGATGGGATTAACAG (F) AAGCTAAATGTCTGTAGTTATCT (R)	21q22.1	Mann <i>et al.</i> , 2001
D21S1246	75.0	≥ 400	GATAAAGTAGACAGGTAACA (F) GGATTATAATTCAAGATGAGAT (R)	21q22.2	GDB
IFNAR (D21S2039)	83.0	231–251	TTACGTCTTCAATTTGATCTTAGCC (F) CCAGGCATGATGGCACAC (R)	21q22.1	GDB, Verma <i>et al.</i> , 1998
		450–500	GTTCTTCATTGATCTTAGCCATC (F) GTGAGATAACTGGCAAGAAGATAA (R)	21q22.1	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D13S631	83.0	189–223	GGCAACAAGAGCAAACTCT (F) TAGCCCTCACCAGTATTGG (R)	13q31–32	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1997
D13S634	81.2	≥ 375	TCCAGATAGGCAGATTCAAT (F) CCTTCTTCTCCCATTTGATA (R)	13q14.3	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1997
		385–440	GGCAGATTCAATAGGATAAATAGA (F) GTAACCCCTCAGGTTCTCAAGTCT (R)	13q14.3	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D13S258	83.3	230–267	ACCTGCCAAATTTTACCAGG (F) GACAGAGAGAGGGAATAAACC (R)	13q21.2–q31	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1999
D13S303	90.9	338–354	ACATCGCTCCTTACCCCATC (F) TGTACCCATTAACCATCCCCA (R)	13q22–q31	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2001
D13S256	90.0	≥ 154	CCTGGGCAACAAGAGCAAA (F) AGCAGAGAGACATAATTGTG (R)	13q14.1–q22	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2001
D13S628	68.8	≥ 247	ACGCCACTTTTCTAAATGCC (F) GGAGTAACAAATAGCAAGGCT (R)	13q31–q32	GDB

Marker name	Heterozygosity (%)	Size of PCR product (bp)	Primer sequence	Chromosome location	Source and reference
		425–470	TAACATTCATTGTCCCTTACAGAT (F) GCAAGGCTATCTAACGATAATCA (R)	13q31–q32	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D13S742	75.0	≥ 364	TCCAGCCTGGTCAACACAG (F) TCCAGACTCCCAATTCAGG (R)	13q11–q21.1	GDB
		235–315	ATAACTGGGCTAGGAATGGAAATA (F) GACTTCCCAATTCAGGAGGACT (R)	13q11–q21.1	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D13S305	75.0	430–465	GCCTGTTTGAGGACCTGTCGTTA (F) TGGTTATAGAGCAGTTAAGGCAC (R)	13q12.1–q14.1	GDB, Mann <i>et al.</i> , 2001
MBP	LOCUS A:80 LOCUS B:79	A: 122–124 B:208–232	GGACCTCTGGAATACAAATC (F) ATTAACTTACCTGTTTCATCC (R)	18q23–ter	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1996
D18S51	88.5	271–331	GAGCCATGTTTCATGCCACTG (F) CAAACCCGACTACGAGCAAC (R)	18q21.33	GDB
	80.2	279–323	CCAACCCGACTACGAGCAAC (F) GAGCCATGTTTCATGCCACTG (R)	18q21.33	*Schmidt <i>et al.</i> , 2000
D18S499	71.0	150–178	CTGCACAACATAGTGAGACCTG (F) AGATTACCCAGAAATGAGATCAGC (R)	18q21.32–q21.33	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2000
D18S380	66.7	≥ 151	CACCTGCATTCTGGGCAAC (F) AGGCTCTTGCTCCTGGAAT (R)	18q22.3–q23	GDB
		160–200	GCATTCTGGGCAACAGGTGAAAC (F) GAGATAACCCAGGCAAGAACAGGA (R)	18q22.3–q23	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D18S391	75.0	≥ 182	CTGTTTTCTGCTTGAGAAG (F) CACTATTCCCATCTGAGTCA (R)	18pter–18p11.22	GDB
		140–180	GGACTTACCAGGCAATGTGACT (F) TAGACTTCACTATTCCCATCTGAG (R)	18pter–18p11.22	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D18S535	74.6	126–156	TCATGTGACAAAAGCCACAC (F) AGACAGAAATAGATGAGAATGCA (R)	18q12.2	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1999
	92.0	455–500	CAGCAAACTTCATGTGACAAAAGC (F) CAATGGTAACCTACTATTACGTC (R)	18q12.2–q12.3	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D18S1002	81.2	286–318	CAAGAGTGAATGCTGTACAAACAGC (F) CAAGATGTGAGTGTCTTTTCAGGAG (R)	18q11	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2000
D18S386	92.3	330–387	TCAGGAGAACTCATTGGAAAC (F) TCCATGAAGTAGCTAAGCAG (R)	18q22.1–q22.2	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1999
	87.5	330–400	TGAGTCAGGAGAATCACTTGGAAAC (F) CTCTTCCATGAAGTAGCTAAGCAG (R)	18q22.1–q22.2	*Mann <i>et al.</i> , 2001
D18S858	82.0	193–211	AGCTGGAGAGGGATAGCATT (F) TGCAATTCGATGAAGTAGGA (R)	18	GDB, G. Voglino personal communication
XHPRT	73.3	260–302	ATGCCACAGATAATACACATCCCC (F) CTCTCCAGAATAGTAGATGATAGTAT (R)	Xq26.1	Pertl <i>et al.</i> , 1997
DXS8377	95.0	203–245	CACCTTCATGGCTTACCACAG (F) GACCTTTGAAAAGCTAGTGT (R)	Xq26	GDB, Schmidt <i>et al.</i> , 2000
Marker name	Heterozygosity (%)	Size of PCR product (bp)	Primer sequence	Chromosome location	Source and reference
DXS6803	86.7	106–125	GAAATGTGCTTTGACAGGAA (F) CAAAAAGGGACATATGCTACTT (R)	Xpter–qter	GDB, Cirigliano <i>et al.</i> , 2001
DXS6809	86.7	242–274	TGAACCTTCTAGCTCAGGA (F) TCTGGAGAATCCAATTTTGC (R)	Xpter–qter	GDB, Cirigliano <i>et al.</i> , 2001
X22	85.2	189–242	TAATGAGAGTTGGAAGAAA (F) CCCATTTGCTACTTGA (R)	Xq28 (PAR2)	Cirigliano <i>et al.</i> , 1999
AMXY		X–432 Y–250	CTGATGGTTGGCCTCAAGCCT (F) ATGAGGAAACCAGGGTTCCA (R)	X and Y	Pertl <i>et al.</i> , 1996
		X–106 Y112	CCCTGGGCTCTGAAAGAATAGT (F) ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG (R)	Xp22.1–22.31 Yp26.1	Cirigliano <i>et al.</i> , 1999
SBMA	90.0	142–178	TCC GCG AAG TGA AGA AC (F) CTT GGG GAG AAC CAT CCT CA (R)	Xq11.2–q12	Schmidt <i>et al.</i> , 2000
DXS981	86.0	230–260	CTCCTTGTTGGCCTTCTTAAATG (F) TTCTCTCCACTTTTCAGAGTCA (R)	Xq11.2–q13.1	GDB, Donaghue <i>et al.</i> , 2003
DXS6854	73.0	90–125	AGCACTTCTCTACAACCCTC (F) CAGCCTGGGCTAGTAGACT (R)	Xq26	GDB, Donaghue <i>et al.</i> , 2003
P39	87.0	140–166	AGCACATGGTAAATGAACCTCCACG (F) CAGTGTGAGTAGCATGCTAGCATTG (R)	Xq28	Donaghue <i>et al.</i> , 2003
DXS996	82.0	130–168	AAATTCCTGCTTAGGCCACTAGG (F) AACGTGTCTTGGATCGTATGCTA (R)	Xp22.3	GDB, Donaghue <i>et al.</i> , 2003
DXS337	83.0	163–193	TGCACTTTCAGCTTTCAGG (F) GTGACAGAGTGAGACCCTGTC (R)	Xp11.3–p11.23	GDB, Pertl <i>et al.</i> , 1999
DXS1283	95.0	203–245	AGTTTAGGAGATTATCAAGCTGG (F) GTTCCCAATAAGATGATCCAG (R)		Schmidt <i>et al.</i> , 2000

4.1.2 Χρήση των STRs στην QF-PCR

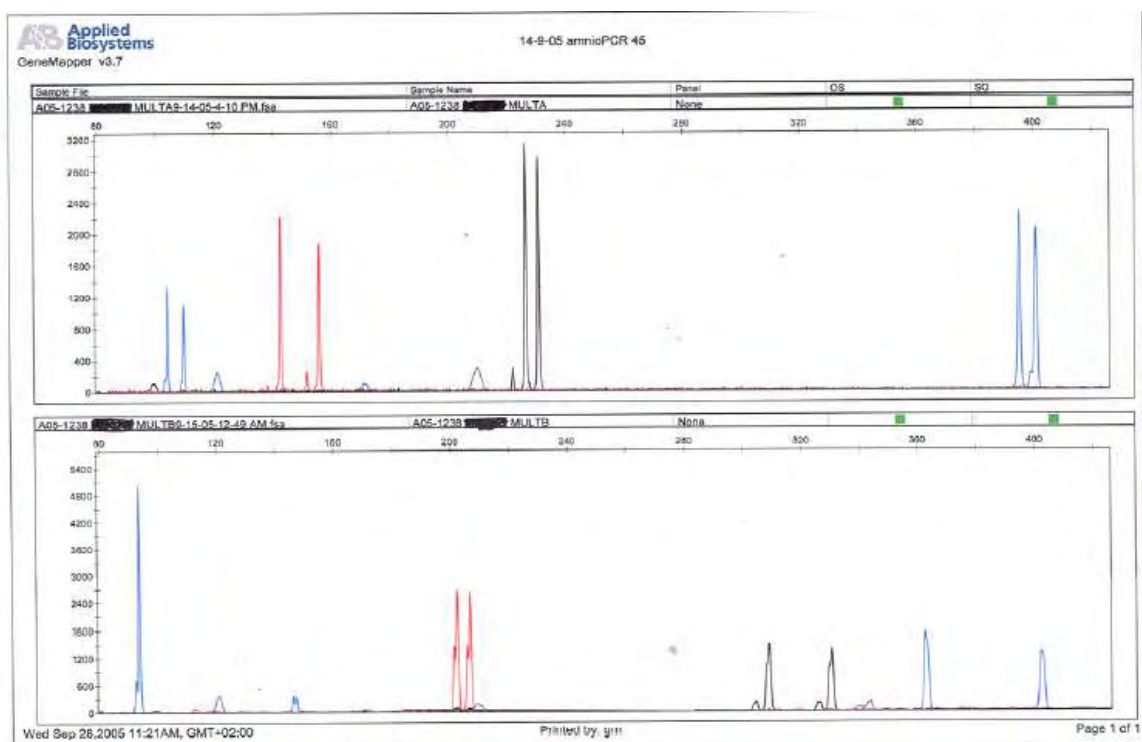
Οι STR δείκτες που χρησιμοποιούμε έχουν διαφορετική ικανότητα να είναι πληροφοριακοί από πληθυσμό σε πληθυσμό . Επομένως , ο αριθμός και η επιλογή των δεικτών που απαιτούνται κάθε φορά για διάγνωση βασίζεται στην ετεροζυγωτία των δεικτών αυτών στο πληθυσμό που μελετάμε .

Τουλάχιστον 2 δείκτες, οι οποίοι να είναι ετερόζυγοι χρειάζονται για το κάθε χρωμόσωμα για να βγει η διάγνωση . Συνεπώς, ιδανικά 3-4 STRs για κάθε χρωμόσωμα χρησιμοποιούνται για να μειώσουν τον αριθμό των μη πληροφοριακών αποτελεσμάτων σε 1-3 Multiplex QF-PCR . Κάτι τέτοιο θα καταδείξει την ετεροζυγωτία των διάφορων STRs δεικτών που χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους κάτι το οποίο θα συνεπάγεται την αποτελεσματικότητα κατά τη διενέργεια συνδυασμών ενίσχυσης STRs με τη χρήση Multiplex PCR .

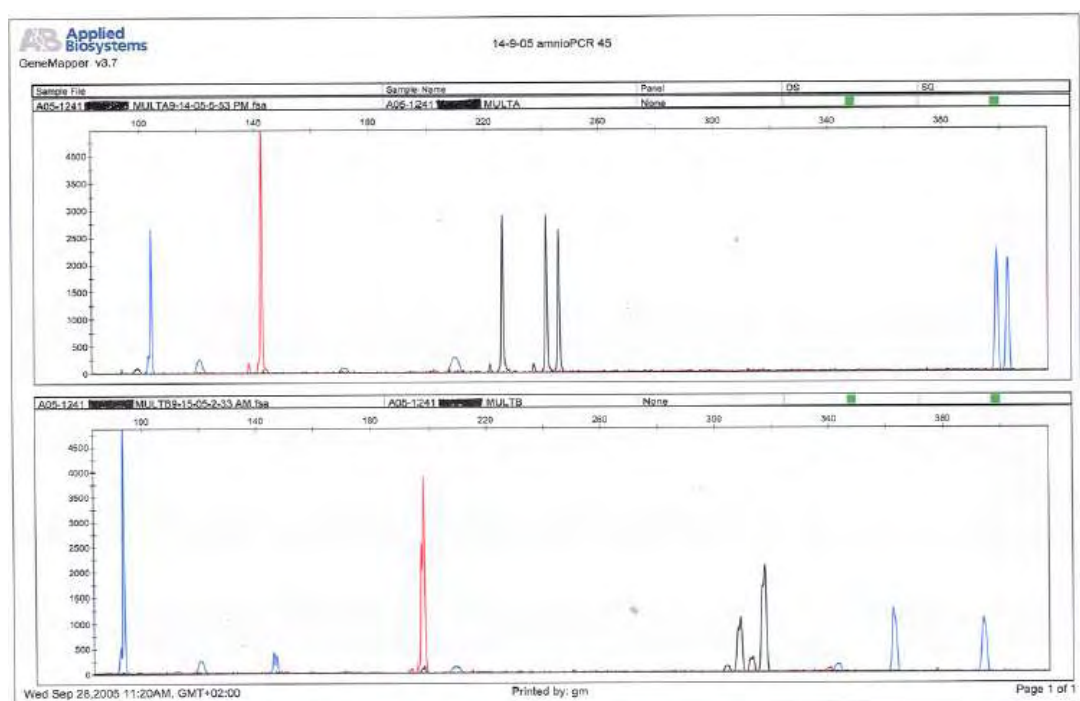
Κάθε εργαστήριο που χρησιμοποιεί QF-PCR θα πρέπει πρώτα να εκτελεί ένα ανεξάρτητο τεστ για να ελέγξει την εγκυρότητα των STRs που χρησιμοποιεί .

Σε περίπτωση που υποψιαζόμαστε μόλυνση από τα μητρικά κύτταρα , είναι δυνατό και πάλι να λάβουμε αποτέλεσμα ακριβείας συγκρίνοντας τα μητρικά STRs με αυτά που προέκυψαν από το έμβρυο .

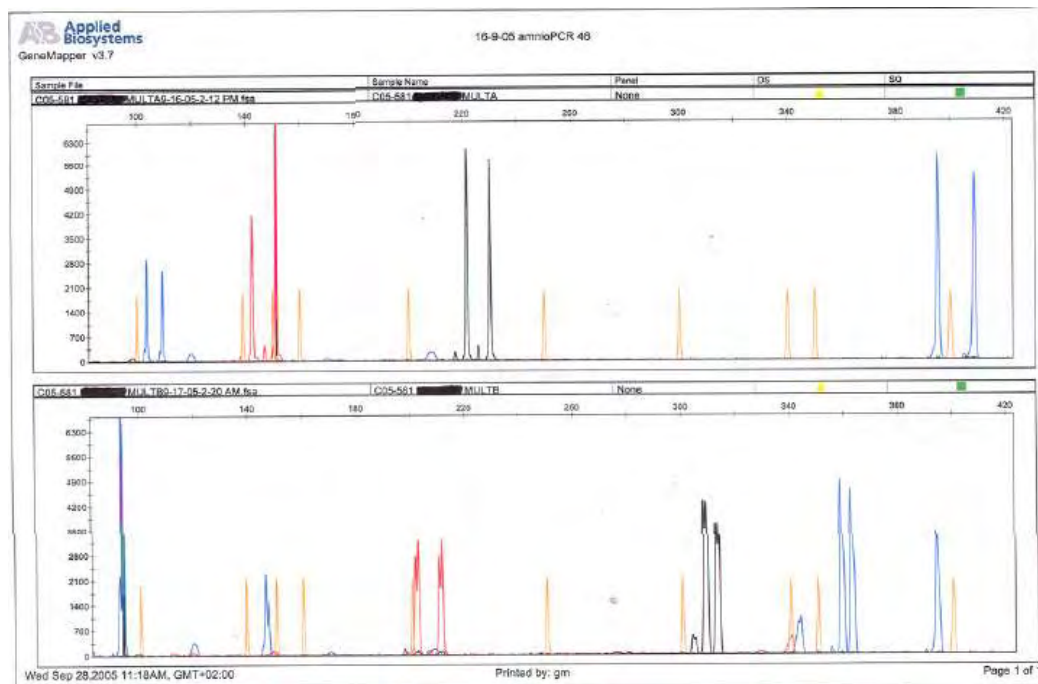
<u>Mult-A</u>	F	R	Dye	PCR product size	F primer sequence	R primer sequence
D21S11	24	24	NED	214-242bp	5' TAT GTG AGT CAA TTC CCC AAG TGA 3'	5' GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC CAG 3'
D18S535	20	25	PET	126-160bp	5' TCA TGT GAC AAA AGC CAC AC 3'	5' AGA CAG AAA TAT AGA TGA GAA TGC A 3'
D13S634	24	24	6-FAM	385-440bp	5' GGC AGA TTC AAT AGG ATA AAT AGA 3'	5' GTA ACC CCT CAG GTT CTC AAG TCT 3'
AMXY	24	24	6-FAM	X:106bp / Y:112bp	5' CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG 3'	5' ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG 3'
<u>Mult-B</u>						
D21S1411	25	23	NED	256-340bp	5' GTA GAT ACA TAA ATA TGA TGA ATG C 3'	5' TAT TAA TGT GTG TCC TTC CAG GC 3'
D18S386	24	24	6-FAM	330-400bp	5' CTC TTC CAT GAA GTA GCT AAG CAG 3'	5' TGA GTC AGG AGA ATC ACT TGG AAC 3'
D13S631	20	19	PET	189-223bp	5' GGC AAC AAG AGC AAA ACT CT 3'	5' TAG CCC TCA CCA TGA TTG G 3'
CF (ΔF508)	24	24	6-FAM	94-97bp	5' GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG CAC 3'	5' GTT GGC ATG CTT TGA TGA CGC TTC 3'
<u>Mult-C</u>						
D21S1412	19	19	6-FAM	384-414bp	5' CGG AGG TTG CAG TGA GTT G 3'	5' GGG AAG GCT ATG GAG GAG A 3'
X22	20	20	NED	189-242bp	5' TAA TGA GAG TTG GAA AGA AA 3'	5' CCC ATT GTT GCT ACT TGA GA 3'
MBP-A/B	20	20	PET	locusA: 119-140bp locusB: 210-230bp	5' ATT TAC CTA CCT GTT CAT CC 3'	5'GGA CCT CGT GAA TTA CAA TC 3'



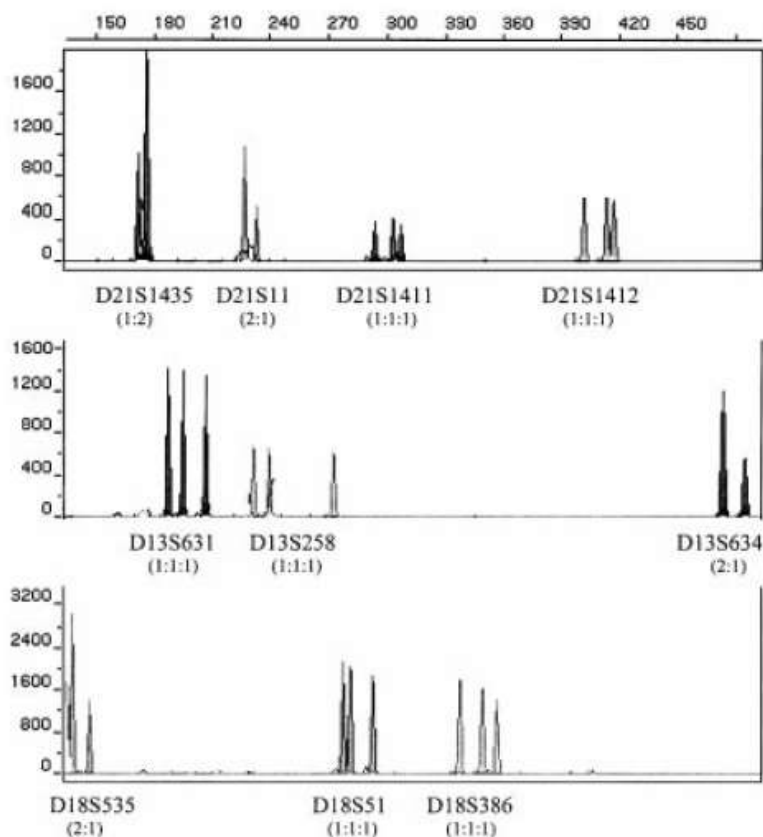
Ταχεία προγεννητική διάγνωση αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 13,18,21 με ανάλυση 2 πολυμορφικών STR περιοχών ανά χρωμόσωμα .Δείγμα 1, φυσιολογικό



Ταχεία προγεννητική διάγνωση αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 13,18,21 με ανάλυση 2 πολυμορφικών STR περιοχών ανά χρωμόσωμα .Δείγμα 2, τρισωμία 21.

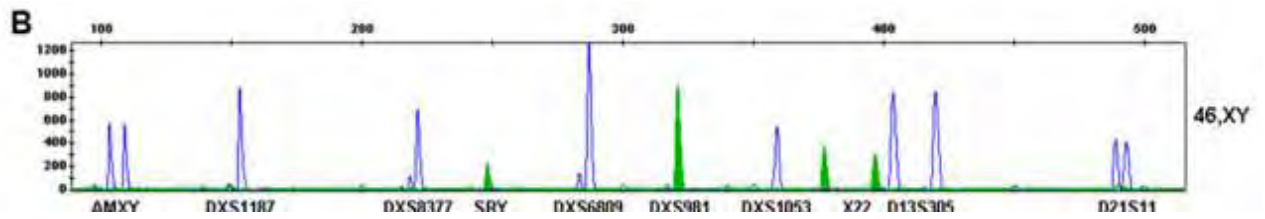


Ταχεία προγεννητική διάγνωση αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 13,18,21 με ανάλυση 2 πολυμορφικών STR περιοχών ανά χρωμόσωμα .Δείγμα 3, τρισωμία 18 .



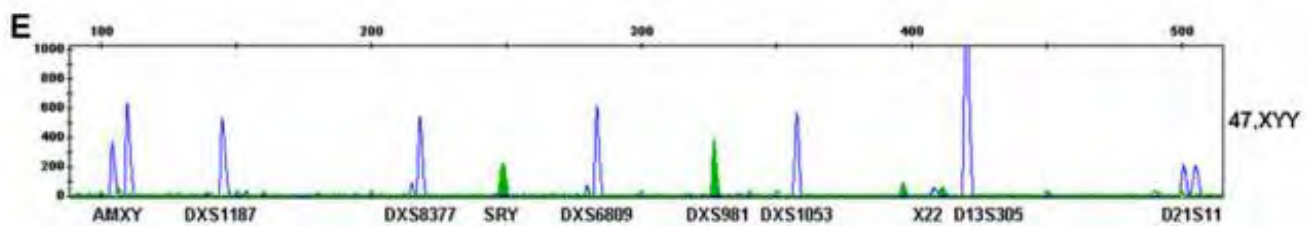
Σειρά 1 : Δείγμα με σύνδρομο Down
Σειρά 2 : Δείγμα με σύνδρομο Patau
Σειρά 3 : Δείγμα με σύνδρομο Edwards.

4.1.3 Χρήση των STRs για ανίχνευση φυλετικών ανευπλοειδιών

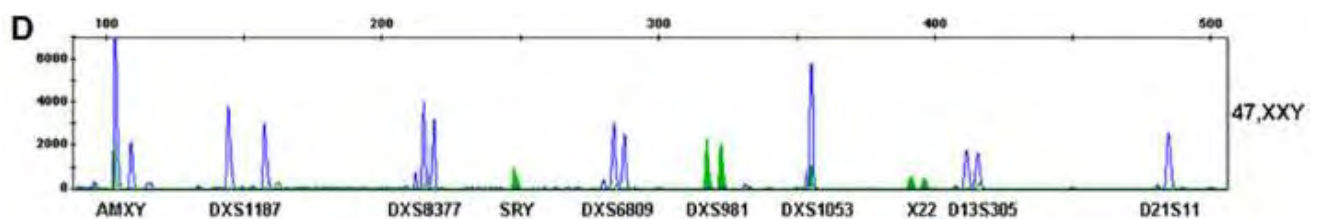


Φυσιολογικό αρρεν άτομο:

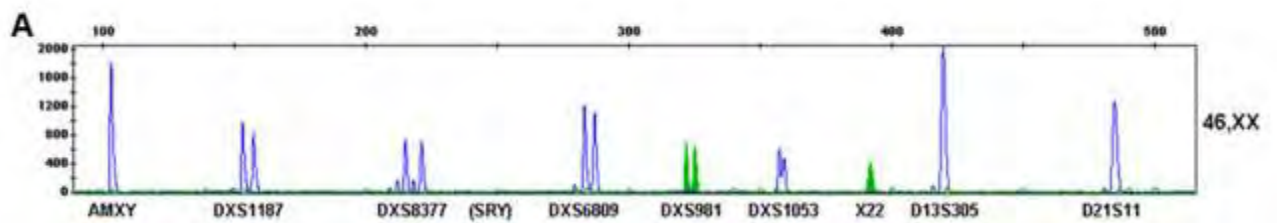
- 2 κορυφές για το AMXY (AMX και AMY)
- 1 κορυφή για το SRY , 1 κορυφή για όλους τους X-linked STRs
- 1 κορυφή ή 2 με αναλογία 1:1 για το X22 STR δείκτη κοινός για X και Y χρωμόσωμα .



- 47,XXY : 2 κορυφές για το AMXY με αναλογία 1:2 (AMX:AMY)
- 1 κορυφή για το SRY , 1 κορυφή για όλους τους X-linked STRs
 - 1 κορυφή ή 2 με αναλογία 1:2 (2:1) ή 3 κορυφές για το X22.

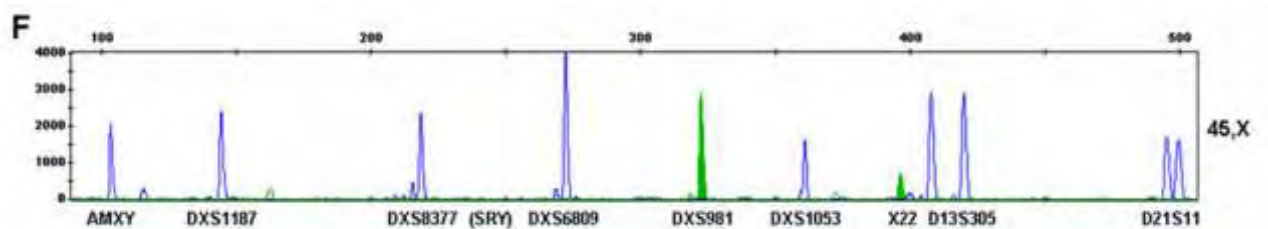


- 47, XXY : 2 κορυφές για το AMXY με αναλογία 2:1 (AMX:AMY)
- 1 κορυφή για το SRY
 - 1 κορυφή ή 2 κορυφές με αναλογία 1:1 για όλους τους X-linked STRs
 - 1 κορυφή ή 2 κορυφές με αναλογία 1:2 (2:1) ή 3 κορυφές με αναλογία 1:1:1 για το X22 STR, ο οποίος είναι κοινός για το X και Y χρωμόσωμα.

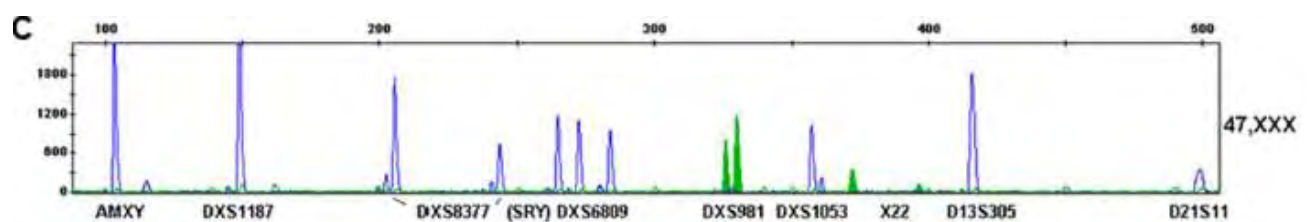


Φυσιολογικό θήλυ άτομο :

1 κορυφή ή 2 κορυφές με αναλογία 1:1 για όλους τους X-linked STRs .



45,XO : 1 κορυφή για κάθε X-linked STRs, X22 και AMXY



47, XXX : 1 κορυφή για το AMXY (αντιστοιχεί μόνο στο AMX)

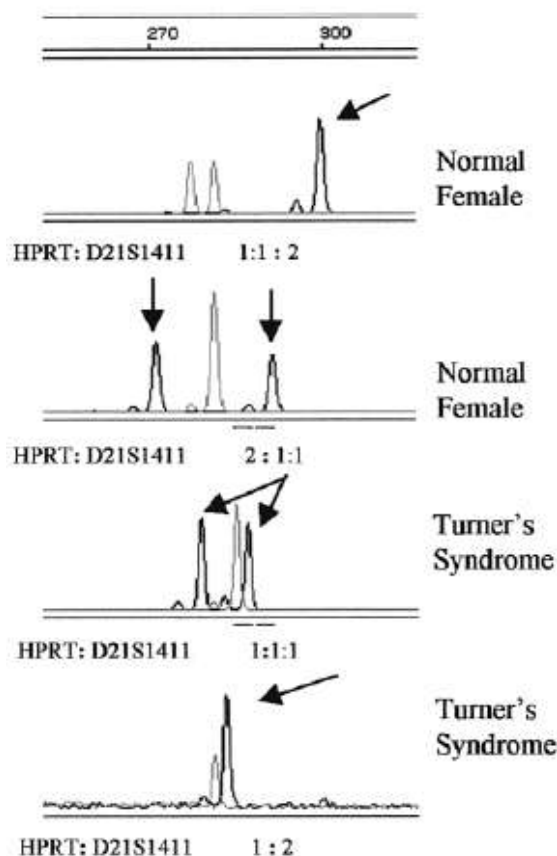
Καμία κορυφή για το SRY,

1 κορυφή ή 2 κορυφές με αναλογία 2:1 ή 1:2 ή 3 κορυφές με αναλογία 1:1:1 για τους X-linked STRs

1 κορυφή ή 2 κορυφές με αναλογία 1:2 (2:1) ή 3 κορυφές με αναλογία 1:1:1 για το X22 .

Το κύριο πρόβλημα της QF-PCR δημιουργείται όταν εξετάζουμε για φυλετικές αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες . Όταν συγκεκριμένοι STRs για το X χρωμόσωμα χρησιμοποιούνται κάποια δείγματα από φυσιολογικά θηλυκά άτομα 46,XX εμφανίζουμε για όλους τους χρησιμοποιούμενες STRs δείκτες ομόζυγα QF-PCR patterns , συνεπώς είναι δύσκολη η διάκριση από το σύνδρομο Turner 45, XO .

Ο Cirigliano et al. (2002) πρότεινε την προσθήκη ενός αυτοσωμικού δείκτη παραδείγματος χάριν του D21S1411 σαν εσωτερικό κοντρόλ για την ποσοτικοποίηση του δείκτη HPRT του X χρωμοσώματος για να λύσει το πρόβλημα μιας και οι δύο αυτοί δείκτες παράγουν αλλήλια πάρα πολύ κοινού μεγέθους και εύκολα μπορούν να αναγνωριστούν χρησιμοποιώντας εκκινητές σημασμένους με διαφορετικές χρωστικές



Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παρουσία ενός έξτρα ή η απουσία ενός σήματος ή μη φυσιολογική αναλογία σε έναν μόνο δείκτη σε μια κατά τα άλλα φυσιολογική Multiplex PCR δε συνεπάγεται απαραίτητα κάποιο artifact. Υπάρχει πιθανότητα να σχετίζεται με διπλασιασμό ή έλλειψη χρωμοσωμικού τμήματος , εκεί όπου ο δείκτης εντοπίζεται . Σε αυτήν την περίπτωση καλό θα ήταν να τσεκάρουμε το ίδιο σήμα αν ανιχνεύεται στο DNA των γονιών λαμβάνοντας δείγμα αίματος από τους γονείς και εκτελώντας QF- PCR με τους ίδιους STR δείκτες. Περαιτέρω ανάλυση την υποψιαζόμενης έλλειψης ή προσθήκης με καρυότυπο επιβάλλεται γιατί μπορεί να αποτελεί έναν αθώο πολυμορφισμό μπορεί όμως να σχετίζεται και με ψυχική ή / και διανοητική καθυστέρηση .

4.2 Προγεννητικός έλεγχος με Quantitative Fluoresence-PCR

Συνοπτικά , η διαδικασία του προγεννητικού ελέγχου με χρήση QF-PCR περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

- Απομόνωση γενετικού υλικού από CVS ή AF
- 4 δείκτες STR για κάθε χρωμόσωμα : 21,13,18
- 8 δείκτες STR για τον προσδιορισμό των ανευπλοειδιών στα φυλετικά χρωμοσώματα
- Συνδυασμός των δεικτών με 3 Multiplex PCR
- Ανάλυση DNA και αποτέλεσμα σε **5 ώρες**





4.2.1 Ευαισθησία της μεθόδου QF-PCR

Ύστερα από πολυάριθμες μελέτες και ανασκοπήσεις (παρατίθενται παρακάτω) η ευαισθησία της μεθόδου για τις κοινές ανευπολοειδίες χωρίς μωσαϊκισμό είναι υψηλή –μέσος όρος 99,3%- και 100% σε κέντρα με μεγάλη εμπειρία . (Cirigliano et al., 2004, 2006, Ogilvie et al., 2005) .

Λίγες φυλετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες δεν ανιχνεύτηκαν (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου αλλά με την εισαγωγή περισσότερων STRs για κάθε χρωμόσωμα μετά το 2001 νέες περιπτώσεις δε σημειώθηκαν. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα : δε σημειώθηκαν με το 2004 .

Authors	Number of samples	Number of amniocenteses	Number of CVS	Number of fetal blood samples	Number of abortuses	Chromosome/number of markers	Sensitivity
Verma et al. [1998]	2,139	2,139				21/2-3	32/33
Pertl et al. [1999a]	247		247			21/4	15/15
						13/2	1/1
						18/3	4/5
Pertl et al. [1999b]	52	52				21/4	2/2
						13/3	0/0
						18/3	3/3
Schmidt et al. [2000]	662	662				XY/3	0/3
						21/3	5/5
						13/3	0/0
						18/3	4/5
Levett et al. [2001]	5,000	5,000				XY/3	5/5
						21/6	57/57
						13/6	8/8
						18/6	17/17
Voglino et al. [2002]	1,653	1,302	61	10	280	X/5, Y/2	16/20
						21	110/110
						13	15/15
						18	40/40
						XY	25/25
Bili et al. [2002]	1,084	1,020	64			21/5	11/13
						13/5	3/3
						18/5	4/5
						XY/3	1/1
Leung et al. [2003]	235	235				21	24/24
						13	6/6
						18	26/26
						XY	1/1
Andonova et al. [2004]	472	426	34		12	21/4	8/8
						18/2	4/4
Curcio et al. [2004]	1,277	996	281			21/4	26/26
						13/3	2/2
						18/3	8/8
						XY/5	6/6
El Mouatassim et al. [2004]	447	447				21/4	5/5
						13/4	1/1
						18/4	2/2
						XY/1	1/1
Quaife et al. [2004]	1,115	NA	NA			21/4	11/11
						13/4	6/6
						18/4	6/6
						XY/4	13/13
Cirigliano et al. [2004]	18,000	16,746	625	123		21/6	344/344
						13/4	61/61
						18/5	162/162
						XY/8	224/225
Ogilvie et al. [2005]	9,080	7,327	1,753			21/2-4	333/333
						13/2-4	54/54
						18/2-4	130/130
						XY/10	36/36
Ochshorn et al. [2006]	63	54	9			21/3	17/17
						13/3	5/5
						18/2	7/7
						XY/2	0/0
Choueiri et al. [2006]	420	420				21/8	20/20
						13/5	1/1
						18/5	3/3
Total	41,946	36,826	3,074	133	292		1,922/1,936 (99.3%)

4.2.2 Πλεονεκτήματα της QF-PCR

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται τα ακόλουθα :

- Μικρότερη απαιτούμενη αρχική ποσότητα εμβρυικού υλικού (CVS ή AF) συνήθως για αμνιακό υγρό απαιτούνται 0,5-1 ml.
- Η QF-PCR ενισχύει DNA από κύτταρα επομένως δε χρειάζεται το κύτταρο να είναι ζωντανό ή άθικτο .Επομένως , αυτό επιτρέπει στην τεχνική αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα που λαμβάνονται πολύ νωρίς κατά την κύηση 12 εβδομάδες της κύησης ή και πολύ αργότερα (34 εβδομάδες) , χωρίς αυτό να επηρεάζει την αξιοπιστία της μεθόδου αυτής. Επίσης , έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις που απέτυχε η καλλιέργεια κυττάρων για δημιουργία καρυότυπου για παράδειγμα είτε λόγω προχωρημένης ηλικίας κύησης (32 εβδομάδες) όπου τα περισσότερα κύτταρα ήταν εκφυλισμένα είτε λόγω αυξημένης επιμόλυνσης των εμβρυικών κυττάρων με μητρικό αίμα αποτυχία σχηματισμού αποικιών .
- Πιο οικονομική και αυτοματοποιημένη μέθοδος με ταυτόχρονη επεξεργασία μεγάλων αριθμών δειγμάτων .συγκριτικά με τη FISH και τον καρυότυπο (Hulten et al., 2003, El Mouatassim et al., 2004, Shaffer and Bui, 2007)
- Είναι γρήγορη μέθοδος αφού δίνει αποτέλεσμα – διάγνωση σε 24- 48 ώρες. Συγκεκριμένα, παρέχει γρήγορα και με ακρίβεια διάγνωση μέσω ανίχνευσης των κύριων αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών , ειδικά σε ένα έμβρυο που από τα υπερηχογραφικά ευρήματα και το βιοχημικό έλεγχο στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου υποψιαζόμαστε χρωμοσωμική ανωμαλία
- Επομένως, είτε μειώνει την ανησυχία του ζευγαριού μέσω αποκλεισμού αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο έμβρυο είτε σε περίπτωση ξεκάθαρης ανίχνευσης χρωμοσωμικής ανωμαλίας δίνει στις οικογένειες τη δυνατότητα να αποφασίσουν για διακοπή της κύησης σε πρωιμότερο στάδιο .
- Δυνατότητα ταυτοποίησης μονοζυγωτικών και διζυγωτικών εμβρύων
- Δυνατότητα επέκτασης της μεθόδου με ενσωμάτωση πολλών πληροφοριακών δεικτών STR ανά χρωμόσωμα
- Δυνατότητα παραλλήλου ελέγχου φορείας σε συχνά μονογονιδιακά νοσήματα πχ μετάλλαξη ΔF508 στο γονίδιο CFTR για έλεγχο κυστικής ίνωσης .

4.2.3 Τεχνικοί περιορισμοί της μεθόδου – μειονεκτήματα της μεθόδου

Η παρουσία στο δείγμα που λαμβάνεται κατά την αμνιοπαρακέντηση μακροσκοπικής επιμόλυνσης με μητρικό αίμα αποκλείει την amnio- PCR. Εντούτοις , η ευρεία χρήση της υπερηχογραφικής καθοδήγησης σε πραγματικό χρόνο της αμνιοπαρακέντησης είναι πιθανό να καταστήσει τη μόλυνση των δειγμάτων με μητρικό αίμα λιγότερο συχνή .

Επιπλέον, με τη χρήση της QF-PCR για προγεννητικό έλεγχο έχουμε απώλεια πληροφοριακότητας σε 0.3% του συνόλου των παθολογικών δειγμάτων που αφορούν :

- Μωσαϊκά
- Άλλες αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες και πολυπλοειδίες
- Δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες αναστροφές , μεταθέσεις, μικροδιπλασιασμοί, μικροελλείμματα, μικροενθέσεις. Υπάρχει η δυνατότητα μείωσης του παραπάνω ποσοστού σε 0,19 % αν συμπεριληφθούν περισσότεροι οληροφοριακοί δείκτες STR για το χρωμόσωμα X για τη διάγνωση του συνδρόμου Turner .

Ακόμη , να αναφερθεί ότι για την εκτέλεση της μεθόδου αυτής απαιτείται εξοπλισμός υψηλού κόστους και εξειδικευμένο προσωπικό .

4.3 Συμπεράσματα

Είναι εφικτή λοιπόν η ταχεία προγεννητική διάγνωση των πιο κοινών τρισωμιών 21,18,13 και των φυλετικών ανωμαλιών με τη χρήση του QF-PCR . Είναι μια αξιόπιστη και με υψηλή ακρίβεια τεχνική που βοηθάει στη διαχείριση της κύησης και μειώνει το άγχος και την ανησυχία των ζευγαριών μέχρι τα αποτελέσματα από τον καρυότυπο .

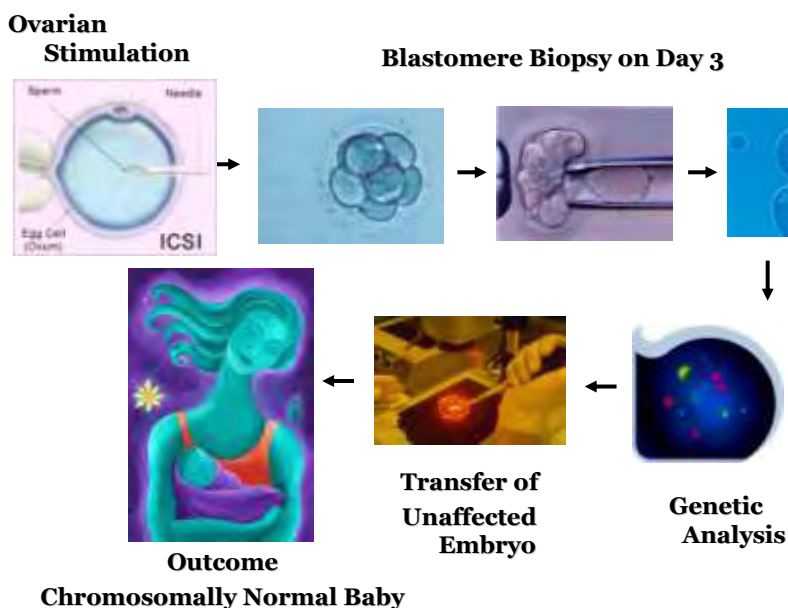
5. Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση –PGD

Πρωτοεφαρμόστηκε το 1989 σε ζευγάρι που βρίσκονταν σε κίνδυνο για μετάδοση φυλοσύνδετου νοσήματος στους απογόνους του με χρήση single cell PCR (Handyside et al 1990) .Συνδυάζει τις εξελίξεις στη μοριακή γενετική και στην τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής .

Τα τελευταία 20 χρόνια , η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση πραγματοποιείται κατόπιν βιοψίας ενός ή δύο βλαστομεριδίων την 3^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση (cleavage stage) με χρήση single cell PCR ή FISH . Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση χρησιμοποιείται σε ζευγάρια που βρίσκονται σε κίνδυνο για συγκεκριμένη για να μεταδώσουν στους απογόνους τους συγκεκριμένη κληρονομική διαταραχή πχ κυστική ίνωση . Οι αναπαραγωγικές επιλογές αυτών των ζευγαριών είναι ή να μείνουν άτεκνοι , να υιοθετήσουν , να χρησιμοποιήσουν δωρεά γαμετών , να μην υποβληθούν σε κανέναν προγεννητικό έλεγχο ,ή να υποβληθούν σε προεμφυτευτική διάγνωση ή / και προγεννητικό έλεγχο .

Τα ζευγάρια που υποβάλλονται σε προεμφυτευτική γενετική διάγνωση έχουν ήδη διαγνωστεί με τη συγκεκριμένη κληρονομική διαταραχή είτε απόκτησης παιδιού που φέρει την ασθένεια είτε έχοντας γνωστό οικογενειακό ιστορικό είτε εμφανίζοντας οι ίδιοι την ασθένεια . Τα περισσότερα ζευγάρια είναι γόνιμα και συχνά έχουν προηγουμένως υποβληθεί σε προγεννητικό έλεγχο και τερματισμό την εγκυμοσύνης εμβρύου που έφερε την ασθένεια .

Η προγεννητική προεμφυτευτική διάγνωση δεν είναι εύκολη επιλογή αφού χρειάζεται χρόνος και να καθορίσει την εγκυρότητα του συγκεκριμένου τεστ για κάθε ζευγάρι . το ζευγάρι πρέπει να υποβληθεί σε εξωσωματική γονιμοποίηση με ότι αυτό συνεπάγεται και τα ποσοστά επιτυχίας της IVF είναι συγκριτικά με τη συμβατική IVF παρόμοια . Επιπλέον , όπως έχει καταγραφεί στο ESHRE PGD Consortium data υπάρχουν περιπτώσεις όπου μετά την PGD όλα έμβρυα από αυτά που προέκυψαν με την IVF έφεραν όλα την ασθένεια όποτε δεν ακολούθησε όπως είναι φυσικό εμβρυομεταφορά . (Harper et al. 2010 a)



5.1 Single Cell PCR

Η single cell PCR είναι PCR με DNA που προκύπτει από ένα και μόνο κύτταρο. Αυτού του είδους PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην προεμφυτευτική διάγνωση που δεν έχουμε τη δυνατότητα να έχουμε στη διάθεση μας περισσότερο γενετικό υλικό .

Βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένου DNA θραύσματος που περιέχει τη μετάλλαξη που προκαλεί την ασθένεια και ανίχνευση αυτής .

Ο αριθμός των ασθενειών που διαγιγνώσκονται μέσω PGD-PCR είναι πάνω από 200 και περιλαμβάνουν και κληρονομικούς καρκίνους όπως το ρετινοβάστωμα, ανίχνευση του BRACA2 γονιδίου . Πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί και για HLA matching (Verlinsky et al., 2001)

Table 4. Sample indications for PGD in single-gene disorders (ESHRE Consortium)²²

Monogenic disorder	Mode of transmission	Cases, n*
B-thalassemia	AR	153
Cystic fibrosis	AR	149
Huntington's disease	AD	136
Fragile-X	X-linked	124
Myotonic dystrophy	AD	124
Spinal muscular atrophy	AR	58
Neurofibromatosis type I	AD	45
Duchenne's muscular dystrophy	X-linked	42
Marfan syndrome	AD	27
Hemophilia A	X-linked	17
Tuberous sclerosis	AD	15

AR: autosomal recessive; AD: autosomal dominant

*Total cases = 2580 cycles to OR

5.1.1 Ειδική προετοιμασία

Απαιτείται ειδική προετοιμασία για τη διενέργεια αυτού του είδους PCR και περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα :

- Προσομοιάζουμε την εξέταση με δείγμα από τον κάθε γονιό
- Κύτταρα από το στέλεχος των γονιών - DNA
- Ειδική μελέτη για την κάθε μετάλλαξη
- Τουλάχιστον 2 δείκτες πληροφοριακοί για το γονίδιο που μελετάμε
- Συνδυασμός των δεικτών σε Multiplex PCR
- Δοκιμή πρωτοκόλλου σε κύτταρα από στέλεχος των γονιών
- Αφού όλα είναι δοκιμασμένα σε 50 τουλάχιστον μονά κύτταρα δίνεται η δυνατότητα στους γονείς να ξεκινήσουν την εξωσωματική γονιμοποίηση .
- Απαιτείται η επιβεβαίωση του πρωτοκόλλου σε 50 κύτταρα για να ελέγξουμε την αξιοπιστία του πρωτοκόλλου που θα χρησιμοποιήσουμε .

5.1.2 Ειδικός εξοπλισμός

Για την εκτέλεση της single cell PCR απαιτείται ειδικός εξοπλισμός όπως :

- Συγκεκριμένος PCR κυκλοποιητής . Το PCR τρέχει σε ξεχωριστό κυκλοποιητή από τα κοινά για αποφυγή επιμόλυνσης
- Μικροσκόπιο για απομόνωση κυττάρου
- Ξεχωριστό Single cell PCR room ελεγχόμενης πρόσβασης και αποστειρωμένο όπου γίνεται η λήψη του κυττάρου και η διάσπαση του. Επίσης, ετοιμάζεται η αντίδραση PCR κάτω από το Hood και τα προϊόντα της PCR ανοίγονται και ετοιμάζονται για να μπουν στο γενετικό αναλυτή .
- Ειδικές πιπέτες και ξεχωριστά αναλώσιμα . Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται ξεχωριστές πιπέτες που αποστειρώνονται με UV ακτινοβολία καθημερινά .και ξεχωριστά ρύγχη με φίλτρο που ανοίγονται μόνο κάτω από το hood .
- Γάντια, ποδιές, κάλυμμα για τα μαλλιά και τα παπούτσια
- Γενετικός αναλυτής

5.1.3 Διαδικασία της single cell PCR

Η διαδικασία της single cell PCR περιλαμβάνει :

1. Το tubing

Tubing λέγεται η διαδικασία που ακολουθούμε για να βάλουμε τα βλαστομερίδια που μας δίνει ο εμβρυολόγος σε σωλήνες και να ξεκινήσουμε την PGD

Χρησιμοποιούμε ένα dissociation buffer για το ξέπλυμα των κυττάρων που περιέχει διάφορα άλατα : NaCl , KCl, NaH₂PO₄, glucose, EDTA, NaHCO₃ , Phenol Red που αποστειρώνονται πρώτα και μετά προστίθεται 4% BSA .

Τα κύτταρα αυτά έπειτα μπαίνουν στους -80 °C για μία ώρα και μετά γίνεται το PCR .

2. Τη λύση του κυττάρου

Αλκαλικό : DTT + 1M KOH ή NaOH + H₂O βάζουμε 2.5 μ L

Σε καθένα από τα σωληνάρια που θα μπει το κύτταρο

Πρωτεϊνάση lysis και SDS βάζουμε 2.5 μ L σε καθένα από τα σωληνάρια που θα μπει το κύτταρο .

Η ενεργοποίηση της λύσης επιτυγχάνεται σε μία ώρα στους 37 °C και απενεργοποίηση με 15 λεπτά στους 99 °C .

3. Τη χρήση θετικών και αρνητικών κοντρολ

Ως αρνητικά κοντρολ μπορούν να χρησιμοποιηθούν :

- lysis buffer
- Λάδι και αντιδραστήρια PCR χωρίς DNA αλλά με νερό .
- Αρνητικά από το tubing

Ως θετικά κοντρολ μπορούν να χρησιμοποιηθούν :

- Για τις αυτοσωμικά επικρατείς ασθένειες , το κοντρολ θα περιλαμβάνει DNA από άτομο που φέρει την ασθένεια όπως επίσης και DNA από φυσιολογικό άτομο .
- Για τις αυτοσωμικά υπολειπόμενες ασθένειες, το κοντρολ θα περιλαμβάνει DNA από άτομο που πάσχει και από άτομο που είναι φορέας για τη συγκεκριμένη ασθένεια .
- Για όλες τις ασθενείες , το κοντρολ θα πρέπει να περιλαμβάνει DNA από τους γονείς για να αξιολογήσουμε του συνδεδεμένους δείκτες .

4 .Θερμικός κυκλοποιητής

Απαιτούνται συνήθως 40-50 κύκλοι . Η διαδικασία περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη ~10 λεπτά και ενεργοποίηση της πολυμεράσης. Ακολουθεί η κλασσική αποδιάταξη ~ 1 λεπτό ανάλογα με το μήκος του προϊόντος με σύνδεση των εκκινητών σε θερμοκρασία ανάλογη με τη σύνθεση των εκκινητών που χρησιμοποιούνται . Έπειτα λαμβάνει χώρα η επιμήκυνση των εκκινητών ~ 2,5 λεπτά και τελική επιμήκυνση ~10 λεπτά .

5. Ανάλυση προϊόντων

Η ανάλυση των προϊόντων πραγματοποιείται από γενετικό αναλυτή .Απαραίτητη κρίνεται η χρήση της QF-PCR και Multiplex PCR γιατί είναι πολύ λίγο το προϊόν για να αναλύσουμε όλους τους απαραίτητους δείκτες .

6. Ανίχνευση ασθένειας

Η μονογονιδιακή ασθένεια και δείκτες για τρισωμία 21, 18, 13, X και Y .

5.1.4 Single Cell PCR – Πλεονεκτήματα

Πρόκειται για μια ιδιαίτερη ευαίσθητη μέθοδο όπου καταφέρνουμε από ένα μόλις κύτταρο να πολλαπλασιάσουμε ένα τμήμα DNA ή περισσότερα μέσω multiplex ώστε να μπορεί να αναλυθεί αργότερα . Ακολουθεί ειδικά πρωτόκολλα προσαρμοσμένα για κάθε ζευγάρι με σκοπό την ανίχνευση της γενετικής ασθένειας που φέρει .

5.1.5 Single Cell PCR - Μειονεκτήματα

Επειδή δουλεύουμε σε επίπεδο DNA ενός κυττάρου χρειάζεται ειδικός εξοπλισμός για την πραγματοποίηση του και πρέπει να δύναται όπως είναι φυσικό ιδιαίτερη έμφαση στη λεπτομέρεια .

Δύο είναι τα κύρια προβλήματα που συνδέονται με τη χρήση του single cell PCR:

Επιμόλυνση

- ✓ Για τη διάγνωση της επιμόλυνσης γίνεται παράλληλα πολλαπλασιασμός ενός ιδιαίτερα πολυμορφικού δείκτη STR .
- ✓ Σε περίπτωση παρουσίας 2 αλληλίων από τον έναν γονιό κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης ή τρισωμίας τα έμβρυα θα πρέπει να απορρίπτονται .
- ✓ Στρατηγικές για τη μείωση της μητρικής ή πατρικής επιμόλυνσης του βλαστομεριδίου που χρησιμοποιείται είναι η απογύμνωση του ωοκυττάρου από τα cumulus cells (Fragouli 2007) καθώς και η χρήση της ICSI .

Allele drop out – ADO φαινόμενο

Είναι το φαινόμενο όταν ένα από τα δύο αλληλόμορφα δεν πολλαπλασιάζεται (Ray et al., 1996) . Συμβαίνει στο 2-20 % στο single cell PCR και μπορεί να οδηγήσει σε λάθος διάγνωση . Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου χρησιμοποιούμε ενισχυμένα πρωτόκολλα και QF- PCR . Επίσης , η ταυτόχρονη ενίσχυση ενός ή περισσότερων πολυμορφικών δεικτών που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και κοντά με το γονίδιο που φέρει τη μετάλλαξη μέσω Multiplex PCR βοηθάει στην καλύτερη διάγνωση (Kuliev et al, 1998, Abou-Sleiman et al., 2002) .

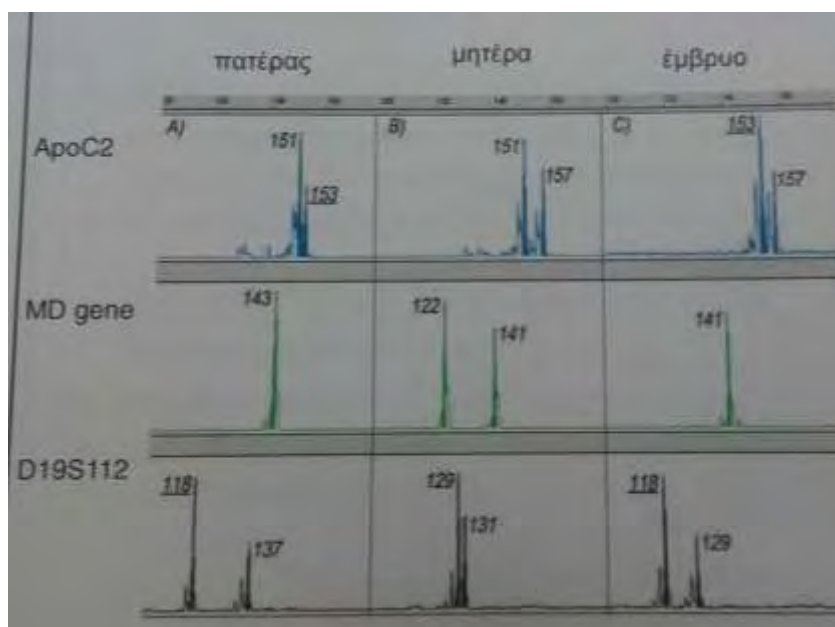
5.1.6 Παράδειγμα εφαρμογής single cell PCR

Μυοτονική Δυστροφία

Η μυοτονική δυστροφία εμφανίζεται με δύο τύπους (ΜΔ1,ΜΔ2) και είναι η πιο συχνή μυϊκή δυστροφία στους ενήλικες με συχνότητα <1:10.000. Κληρονομείται με επικρατή τύπο (κληρονομείται από τον ένα γονέα). Είναι ένα πολυσυστηματικό νόσημα προκαλεί μυϊκή αδυναμία και επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, τη καρδιά, τα μάτια (καταρράκτη) και τους ενδοκρινείς αδένες. Στη μορφή ΜΔ2 ή εγγύς μυοτονική δυστροφία προσβάλλονται αντίθετα με τη μυοτονική δυστροφία τύπου 1, κυρίως οι μύς του κορμού.

Η μυοτονική δυστροφία (ΜΔ) επιβεβαιώνεται με ανάλυση DNA και την ανίχνευση επέκτασης του τρινουκλεοτιδίου CTG στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου DMPK (Dystrophic Myelin Proteinase kinase). Πολλαπλές επαναλήψεις τριπλέτας GTC στο γονίδιο της μυοτονίνης 5-15 επαναλήψεις θεωρούνται φυσιολογικές ενώ περισσότερες από 50 συνεπάγονται ασθένεια. Έχει αποδειχτεί σχέση μεταξύ τους μήκους των επαναλήψεων της τριπλέτας GTC και της σοβαρότητας και της ηλικίας έναρξης της μυοτονικής δυστροφίας .. Από τις δύο μορφές η μορφή MD1 εμφανίζει επίσπευση δηλαδή σε κάθε γενιά μπορεί να εμφανιστεί η νόσος νωρίτερα και σε βαρύτερη μορφή οπότε είναι σημαντικός ο ρόλος του προγεννητικού ελέγχου ενώ στη MD2 η νόσος φαίνεται να έχει σταθερή εικόνα ανάμεσα στα μέλη των οικογενειών που νοσούν.

Ο γονιός που έχει μυοτονική δυστροφία εμφανίζει μόνο μια κορυφή αφού η άλλη λόγω του αριθμού των επαναλήψεων δεν πολλαπλασιάζεται



Το αλληλόμορφο που ακολουθεί τη μετάλλαξη βρίσκεται με τη βοήθεια δείγματος συγγενή ή προηγούμενου CVS

5.1.7 Συμπεράσματα

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση πραγματοποιείται κυρίως ύστερα από ICSI την 3^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση (cleavage stage) με τη βιοψία ενός βλαστομεριδίου και γενετική ανάλυση με χρήση single cell PCR. Για κάθε ασθένεια που μελετάμε και κάθε ζευγάρι υπάρχει ειδικό πρωτόκολλο ανίχνευσης. Ανιχνεύει μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία μονογονιδιακές διαταραχές, X- φυλοσύνδετες ασθένειες και χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες δίνοντας στα ζευγάρια που υποβάλλονται σε PGD την δυνατότητα για απόκτηση παιδιού που δε κληρονόμησε την εν λόγω ασθένεια. Επιπλέον, η PGD τα τελευταία χρόνια έχει εφαρμοστεί και για έλεγχο ιστοσυμβατότητας σε ζευγάρια που ήδη έχουν αποκτήσει παιδί που πάσχει από β – μεσογειακή αναιμία με σκοπό τη γέννηση υγιούς παιδιού συμβατού δότη για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Η χρήση της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης για έλεγχο ανευπλοειδιών σε υπογόνιμα ζευγάρια με αυξημένη μητρική ηλικία, επαναλαμβανόμενες αποβολές, επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης δε φαίνεται να βελτιώνει τα ποσοστά κύησης και εμφύτευσης. Οι έρευνες στρέφονται κυρίως στη χρήση περισσότερων κυττάρων όπως σε επίπεδο βλαστοκύστης που εμφανίζει και μικρότερα ποσοστά μωσαϊκισμού με χρήση ακόμα νεότερων τεχνικών, κρυοσυντήρηση του εμβρύου και εμφύτευση σε επόμενο κύκλο. Νέες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι ο μοριακός καρυότυπος, η single nucleotide polymorphism array (SNP-array), η Real-time PCR, η Q-PCR και η Next-Generation sequencing (NGS). Συμπερασματικά, η προγεννητική διάγνωση ενός εμβρύου είναι υψίστης σημασίας διαδικασία αφού δύναται να επηρεάσει όχι μόνο το άτομο που νοσεί αλλά και την οικογένεια του.

6. Βιβλιογραφία

- Kakourou G, Dhanjal S, Mamas T, Gotts S, Doshi A, Fordham K, Serhal P, Ranieri DM, Delhanty JDA, Harper JC, SenGupta SB (2008) Preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy type 1 in the UK. *Neuromuscul Disord* 18:131–136 Kakouro
- G, Dhanjal S, Mamas T, Serhal P, Delhanty JD, SenGupta SB (2010) Modification of the triplet repeat primed PCR (TPPCR) method for detection of the CTG repeat expansion in myotonic dystrophy type 1 (DM1): application in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 94(5):1674–1679 (Epub 2010 Feb 19)
- Munne´ S, Sultan KM, Weier HU et al (1995b) Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol* 172(4 Pt 1):1191–1199
- Rechitsky S, Kuliev A, Sharapova T, Laziuk K, Ozen S, Barsky I, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y (2006) Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reprod. Biomed Online* 12(1):89–100
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM (1992) Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 12(2):103–110 PubMed PMID: 1553355
- Harper JC (2009) In: Preimplantation genetic diagnosis. Cambridge University Press, Cambridge Harper JC, Harton G (2010) The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 94(4):1173–1177 (Epub 2010 Jun 25. Review)
- Harper JC, Coonen E, Ramaekers FCS, Delhanty JDA, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN (1994) Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in situ hybridisation using directly labelled probes. *Hum Reprod* 9:721–724
- Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN, Delhanty JDA (1995) Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic, preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 15:41–49
- Harper JC, de Die-Smulders C, Goossens V, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Van Rij MC, Viville S, Wilton L, Sermon KD (2008) ESHRE PGD Consortium data collection VII: Cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. *Human Reprod* 23(4):741–755

- Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Goossens V (2010a) ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Human Reprod* 25(11):2685–2707]
- Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraedts J, Goossens V, Harton G, Pehlivan Budak T, Renwick P, Sengupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K (2010b) What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee. *Hum Reprod* 25(4):821–823
- Harper JC, Sengupta S, Vesela K, Thornhill A, Dequeker E, Coonen E, Morris MA (2010c) Accreditation of the PGD laboratory. *Hum Reprod* 25(4):1051–1065 (Epub 2010 Jan 23. PubMed PMID: 20097923)
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A, Wells D (2011) Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 26(2):480–490 (Epub 2010 Dec 8. PubMed PMID: 21147821)
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK (2010) Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 47(10):651–658 (Epub 2009 Oct 25)
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH (1990) Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 5(6):708–814 (PubMed PMID: 2254404)
- Lorda-Sanchez MB, Petersen F, Binkert M. A 48,XXY,+21 Down syndrome patient with additional paternal X and maternal 21. *Hum Genet.* 1991; 87(1): 54-56.
- Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet.* 1984; 18(1): 69-97.
- Von Eggeling F, Freytag M, Fahsold R, Horsthemke B, Claussen U. Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR. *Hum Genet.* 1993; 91(6): 567-570.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1997; 17(13): 1299-1311.
- Mansfield ES, Kronick MN. Alternative labeling techniques for automated fluorescence based analysis of PCR products. *Biotechniques.* 1993; 15(2): 274-279.
- Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 4(3): 333-337.

- Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol.* 2003; 51(3): 156-160. 12. Mann K, Ogilvie CM. Prenatal detection of chromosome disorders. *Lancet.* 2001; 358(9293): 1030-1031. 13.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet.* 1999; 36(4): 300-303.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet.* 1999; 36(4): 300-303.
- Rahil H, Solassol J, Philippe C, Lefort G, Jonveaux P. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10(8): 462-466.
- Verma L, MacDonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hultén M. Rapid and simple prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet.* 1998; 352(9121): 9-12.
- Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet.* 1998; 62(1): 9-23.
- Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. 2004. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod* 10:839–846.
- Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Canadas MP, Ordonez E, Lloveras E, Plaja A, Fuster C, Adinolfi M. 2006. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann NY Acad Sci* 1075:288–298
- El Mouatassim S, Becker M, Kuzio S, Ronsin C, Gil S, Nouchy M, Druard L, Forestier F. 2004. Prenatal diagnosis of common aneuploidies using multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther* 19:496–503.
- Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. 2004. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: Time for reconsideration. *Hum Reprod Update* 10:541–548
- Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M. 1994. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 343:1197– 1198.
- Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B, Adinolfi M. 1999a. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: First application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 36: 300–303.

- Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P, Adinolfi M. 1999b. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 5:1176–1179
- Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, Waters JJ, Scriven PN, Flinter F. 2005. The future of prenatal diagnosis: Rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. *BJOG* 112:1369–1375
- Verma L, Macdonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hulten M. 1998. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 352:9–12.
- Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, Trengia V, Caserta D, Bonu MA, Borini A, Baldi M (2006) Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 21(3):670–684 (Epub 2005 Nov 25. PubMed PMID: 16311287)